SUBSTRATAUFNAHME UND PHOSPHATSTOFFWECHSEL BEI EINZELLIGEN GRÜNALGEN (ANKISTRODESMUS BRAUNII) IM DUNKELN UND IM LICHT

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Gernot Lysek

aus Coburg

Würzburg 1966

1967

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544724_0051

SUBSTRATAUFNAHME UND PHOSPHATSTOFFWECHSEL BEI EINZELLIGEN GRÜNALGEN (ANKISTRODESMUS BRAUNII) IM DUNKELN UND IM LICHT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde

der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Gernot Lysek

aus Coburg

Würzburg 1966

Referent: Professor Dr. Wilhelm Simonis

Tag der Einreichung: 13. Januar 1967

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Februar 1967

Tag der Promotion: 22. 3. 67

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Diese Arbeit wurde in den Jahren 1962 bis 1966 im Botanischen Institut der Universität Würzburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Simonis durchgeführt. Ich möchte ihm an dieser Stelle für die Themenstellung, die Anregungen und Aussprachen während der Arbeit und die stete Förderung, besonders durch die Überlassung einer Verwalterstelle nach dem Staatsexamen, herzlich danken.

Dem Cusanuswerk, Bad Godesberg, danke ich für die Gewährung eines Stipendiums.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
2 Material und Methodik	3
21 Versuchsmaterial	3
211 Anzucht der Schwachlichtalgen	3
2111 Die Nährlösung	3
2112 Kulturflaschen, Raum, Beleuchtung	4
2113 Durchlüftung	4
2114 Wachstum	4
212 Anzucht der Synchronalgen	5
2121 Nährlösung	5
2122 Kulturbedingungen	6
22 Methodik der Versuche	6
221 Anzucht der Algen für die Versuche	6
2211 Schwachlichtalgen für die ^{32}P-Einlagerungsversuche	6
2212 Schwachlichtalgen für die Glykolsäure-Aufnahmeversuche	7
2213 Synchronalgen für die ^{32}P-Einlagerungsversuche	8
2214 Mit ^{32}P-vormarkierte Synchronalgen	9
2215 Synchronalgen für die Glucose-Aufnameversuche	9
222 Benutzte Apparaturen	9
2221 Einlagerungsapparatur	9
2222 Warburg-Apparat	11
2223 Meßapparate für ^{32}P	11
2224 pH-Meter	11
2225 Photometer	11
Für die Versuche verwendete Reagenzien	12
224 Ausführung der Versuche mit ^{32}P	14
2241 Einlagerungsversuche mit Schwachlichtalgen	14
2242 Einlagerungsversuche mit Synchronalgen	15
2243 Versuche mit ^{32}P-vormarkierten Synchronalgen	15

Seite

225 Extraktion und Fraktionierung 16
2251 Abtöten und Extraktion mit TCE 16
2252 Aufarbeitung der TCE-Extrakte 17
2253 Bestimmung des TCE-unlöslichen ^{32}P 20
2254 Extraktion zur weiteren Auftrennung de des Pu 20
2255 Weitere Auftrennung der erhaltenen Fraktionen 21
226 Substrataufnahme-Versuche 22
2261 Untersuchung der Glykolsäure-Aufnahme 22
2262 Bestimmung der Glykolsäure 22
2263 Glucose-Aufnahmeversuche 24
2264 Bestimmung der Glucose 25
23 Weitere Bestimmungen zu den Versuchen 26
2301 Trockengewicht 26
2302 $^{31}PO_4$-Gehalt der Algen 26
2303 Chlorophyllgehalt 27
2304 Zelldichte 27
24 Berechnung und Auswertung der Ergebnisse 27
2401 Berechnung der Aktivitäten 27
2402 Berechnungen der inaktiven Versuche 27
2403 Parallelproben 28
3 Ergebnisse 29
311 Wirkung der Glykolsäure auf die lichtabhängige Phosphorylierung 29
3111 Einfluß verschiedener Glykolsäurekonzentrationen 29
3112 Wirkung der Glykolsäure in Gegenwart von Alkali-Ionen 31
3113 Vorgaben von Glykolsäure 34
312 Versuche zur Glykolsäureaufnahme 37
32 Einwirkung der Glucose auf den Phosphateinbau 39
321 Einwirkung verschiedener Glucosekonzentrationen 39
3211 Kurzzeiteinlagerung 39

3212 Langzeitversuche mit höheren Phosphatkonzentrationen 42
322 pH-Abhängigkeit der Glucosewirkung 43
323 Vorgaben von Glucose 45
33 Glucosewirkung auf vormarkierte Algen 48
331 Glucosezugabe zu vormarkierten Algen 48
332 Wirkung von Glucose auf vormarkierte Algen bei Anwesenheit von CO_2 50
34 Versuche mit 2-Desoxy-glucose 52
341 Einfluß der 2-Desoxy-glucose auf die ^{32}P-Aufnahme 52
342 Wirkung von 2-Desoxy-glucose auf vormarkierte Algen 54
343 Einfluß von Glucose und 2-Desoxy-glucose auf vormarkierte Algen; Auftrennung der Fraktionen 56
3431 Die Verbindungen des TCE-Extraktes 56
3432 Äthanol-Äther-lösliches P 59
3433 Glycinpuffer-lösliches P 60
3434 NaOH-lösliches P 60
3435 Rest-P 61
35 Wirkung von Hemmstoffen 64
351 Untersuchung der Glucoseaufnahme 64
3512 Uranylhemmung der Glucoseaufnahme 66
352 Aufnahme der 2-Desoxy-glucose durch vormarkierte Algen nach Hemmung mit DCMU und Antimycin A 68
36 Stöchiometrie 71
4 Diskussion 73
41 Deutung der Mit Glykolsäure erzielten Ergebnisse 73
4111 Einfluß des pH-Wertes auf die Glykolsäureaufnahme 73
4112 Einfluß des P-Mangels auf die Glykolsäureaufnahme 74
4113 Biochemische Unterschiede zwischen den einzelnen Algenstämmen 75

Seite

42 Deutung der Versuche mit Glucose und 2-Desoxy-glucose 76
421 These 76
422 Definitionen 76
4221 Aufnahme 76
4222 Transport 77
4223 Weiterverarbeitung 77
4224 Photoassimilation 77
423 Zusatzannahmen 78
424 Begründung der These 78
4241 Erhöhung der ^{32}P-Einlagerung in das Po bei Glucosegaben 78
4242 Versuche mit vormarkierten Algen 79
4243 Die Ergebnisse der genaueren Auftrennung der Fraktionen 79
4244 Uranylhemmung der Glucoseaufnahme 81
4245 Die Energiequelle 81
4246 Versuche mit Antimycin A und DCMU 83
4247 Die Einwirkung des Lichtes 84
425 Kritik an der Beweisführung 85
4251 Isolierung des Fermentes 85
4252 Welche Reaktionen katalysiert das Ferment? 86
4253 Warum der Umweg über die Polyphosphate 87
4254 Die stöchiometrischen Verhältnisse 87
4255 Übertragbarkeit der Ergebnisse 88
4256 Sind die Ergebnisse der Versuche mit Glucose und mit 2-Desoxy-glucose vergleichbar 89

5 Anhang 93
51 Zusammenfassung 93
52 Verzeichnis der Abkürzungen 96
53 Literaturverzeichnis 97
54 Lebenslauf 107

1 Einleitung

Im Jahre 1951 entdeckte STREHLER die Rolle bestimmter Phosphatverbindungen als Energieüberträger bei der Photosynthese, wie es bereits von RUBEN (1943) postuliert worden war (vgl. dazu auch EMMERSON und Mitarb. 1944; KANDLER 1950; SIMONIS und GRUBE 1953; sowie die Zusammenfassung SIMONIS 1960). Die Bildung energiereicher Phosphatverbindungen mit Hilfe der Lichtenergie, die Photosynthesephosphorylierung, haben ARNON und Mitarb. später auch an isolierten Chloroplasten gefunden und untersucht (vgl. die Zusammenfassung ARNON 1963). Mit diesen Entdeckungen erhob sich die Frage, ob diese Phosphatbindungsenergie nur in den Chloroplasten selbst, oder auch außerhalb, d. h. im Cytoplasma, verfügbar ist.
Die Arbeitsgruppe von HEBER (vgl. SANTARIUS und Mitarb. 1964) hat in der letzten Zeit zeigen können, daß das in den Chloroplasten gebildete ATP schnell in das Cytoplasma übertritt und dort verbraucht werden kann. Gleichzeitig ist bei verschiedenen energieabhängigen Prozessen, so bei der Elektrolyt- und Anelektrolytaufnahme, eine deutliche Lichtabhängigkeit festgestellt worden. Erwähnt seien hier als Beispiel die Untersuchung der Phosphataufnahme an Ankistrodesmus braunii mit Hilfe von radioaktivem Phosphat (^{32}P) durch SIMONIS und Mitarb.(1962; SIMONIS und MECHLER 1963) und die Untersuchung der Glucoseaufnahme bei Chlorella pyrenoidosa durch KANDLER und Mitarb. (KANDLER 1954; TANNER und Mitarb. 1965). KANDLER und Mitarb. betrachteten die im Licht deutlich erhöhte Glucoseaufnahme sogar als Indikator der ihr korrelierten lichtabhängigen Phosphorylierung. Die dabei gefundenen Licht-Dunkel-Unterschiede der Glucoseaufnahme konnten im Verlauf dieser Arbeit an Ankistrodesmus braunii bestätigt werden. Allerdings entsprachen sowohl bei KANDLER, wie bei den hier berichteten Untersuchungen die Spiegelschwankungen der einzel-

nen Phosphatfraktionen im Licht nur bedingt der erhöhten Glucoseaufnahme. Im Dunkeln riefen die Glucosegaben eine erheblich größere relative Änderung des Phosphatstoffwechsels hervor als im Licht, was an Ankistrodesmus braunii schon MOSTAFA (1960) gefunden hatte. Er hatte, ebenso wie bei den hier berichteten Versuchen, markiertes Phosphat ($^{32}PO_4^{---}$) benutzt, das eine genauere Analyse ermöglichte.

Das Ziel dieser Arbeit war daher, den Zusammenhang zwischen der im Licht gesteigerten Substrataufnahme und dem Phosphatstoffwechsel zu untersuchen. Es sollte daher geprüft werden, ob mit anderen Methoden eventuell eine Beteiligung anderer Substanzen bzw. Energieüberträger festgestellt werden kann, oder ob sich nicht eine andere Deutung der lichtabhängigen Substrataufnahme finden läßt. Dabei wurde zunächst im Anschluß an JACOBI (1959), der eine Beteiligung der Glykolsäure am Phosphatstoffwechsel bei Ankistrodesmus braunii gefunden hatte, versucht, Glykolsäure als Substrat zu verwenden. Dies erwies sich aber als unmöglich, die Ergebnisse von JACOBI (1959) mußten anders gedeutet werden (Vgl. Abs. 31). Deshalb wurden die Untersuchungen mit Glucose bzw. mit 2-Desoxyglucose als glucose-analoger Verbindung, fortgesetzt. Im Verlauf der Untersuchungen erwies es sich als notwendig, die im Licht gesteigerte Glucoseaufnahme nicht als Lichtabhängigkeit der Glucoseaufnahme selbst, sondern als Folge der Glucoseverarbeitung - die aber u. U. begrenzender Faktor für die Aufnahme sein kann - zu deuten.

2 Material und Methodik

21 Versuchsmaterial

Als Versuchsobjekt diente ein Stamm der einzelligen Grünalge Ankistrodesmus (=Raphidium) braunii (Naegeli) Brunnth. (Fam. Oocystaceae, Ordn. Chlorococcales), Stamm Nr. 202-70 der Algensammlung Pringsheim. Diese Algen pflanzen sich nicht sexuell fort, sondern vermehren sich nur vegetativ durch Autosporen (FOTT 1959). Sie eignen sich daher gut für eine Dauerkultur.

Für die Untersuchungen wurden so wohl nichtsynchron gezogene (=Schwachlicht-)Algen, wie auch synchron gezogene (=Starklicht-)Algen, verwendet. Im folgenden sollen deshalb beide Kulturmethoden beschrieben werden. Die zuerst beschriebenen nichtsynchronen (=Schwachlicht-)Algen wurden für die Versuche mit Glykolsäure, die Synchronalgen (=Starklichtalgen) für die Versuche mit Glucose und 2-Desoxyglucose benutzt.

211 Anzucht der Schwachlichtalgen.

2111 Die Nährlösung

Die Algen wurden von Reinkulturen auf Schrägagar abgenommen und in Kulturkolben übergeimpft. Als Nährlösung diente die von KANDLER (1950) veränderte anorganische Nährlösung nach PIRSON (1939), die folgende Bestandteile enthielt:

0,4 g KNO_3, 0,1 g KH_2PO_4,
0,1 g $MgSO_4.7H_2O$, 0,1 g $Ca(NO_3)_2.4H_2O$,
0,1 g KCl, 0,1 mg $FeCl_3$,
1,0 ml A-Z-Spurenelementlösung nach Hoagland,
ad 1000 ml aqua dest..

Die Stammkultur wurde zwei Mal in der Woche umgesetzt Dazu wurden die Algen bei ca 1400 g abzentrifugiert und in frischer Nährlösung aufgeschwemmt.

2112 Kulturflaschen, Raum, Beleuchtung.

Für die Anzucht dienten spezielle Kulturflaschen (URBACH 1961). Sie waren ca 75 cm hoch, Ø 5 cm. Am unteren, zugespitzten Ende besaßen sie einen Schliffhahn, durch die die Algensuspension abgelassen werden konnte. Unmittelbar über diesem Hahn mündete das von oben hereingeführte Belüftungsrohr. Die Algenflaschen hingen an einem Holzgestell in zwei Reihen, zwischen denen sich zur Beleuchtung Leuchtstoffröhren (100 cm lang, 25 W) und Glühbirnen (40 W) befanden. Zusammen ergaben sie eine Beleuchtungsstärke von ca 2×10^3 Lux an der Oberfläche der Kulturkolben. Eine Schaltuhr regelte Dauer und Rhythmus der Beleuchtung.(16 h Licht und 8 h Dunkelheit am Tag). Der Raum, in dem sich die Kulturen befanden, wurde durch zwei Thermoregler ständig auf 25 $\pm$ 1° C gehalten.

2113 Durchlüftung.

Für die Durchlüftung der Algensuspensionen diente normale Preßluft ohne zusätzliches CO_2. In vorgeschalteten Waschflaschen mit Wasser, Sublimat- und Kupfersulfatlösung wurde die Luft angefeuchtet, erwärmt und entkeimt. Vor jeder Algenflasche sorgte ein Wattefilter für die Reinigung der Luft von mitgerissenen Partikeln und Wassertropfen. Die durch die Algensuspension perlende Luft bewegte diese gleichzeitig und verhinderte dadurch, daß sich die Algen am Glas absetzten.

2114 Wachstum.

Unter diesen Bedingungen vermehrten sich die Algen sehr gleichmäßig, in drei Tagen auf das 2-3-Fache. Die relativ niedrige Beleuchtungsstärke (2×10^3 Lux) und die geringe CO_2-Versorgung ließen allerdings trotz der diskontinuierlichen Beleuchtung eine Synchronisation der Algen nicht zu. Dadurch stand aber für die Versuche sehr einheitliches Material zur

Verfügung, das immer aus Algen aller physiologischer Zustände bestand. Die Algensuspensionen wurden, da sie nicht steril waren, laufend mikroskopisch untersucht. So bald sich Veränderungen oder Verunreinigungen der Kulturen zeigten (Zusammenballungen der Algen, Verunreinigungen durch Bakterien oder andere Algen, etc.), wurden sie verworfen und neu angesetzt.
Trotz dieser gleichmäßigen Bedingungen zeigte es sich, daß das Wachstum der Algen jahreszeitlich etwas schwankte. Im Frühjahr und im Herbst wuchsen sie besser als im Winter. Die Ursachen hierfür sind noch unklar.

212 Anzucht der Synchronalgen

2121 Nährlösung.

Die Anzucht erfolgte im wesentlichen ebenso wie die der Schwachlichtalgen. Die Nährlösung hatte jedoch eine andere Zusammensetzung. Sie war nach PIRSON und RUPPEL (1962), sowie nach KADEN-DOMANSKI (1965) folgendermaßen zusammengesetzt:

0,8090 g KNO_3, 0,6800 g $NaNO_3$,
0,0236 g $Ca(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$, 0,2470 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,
0,0010 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,4680 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$,
0,1780 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$,
0,0038 g Fe^{++} als $FeSO_4$ im EDTA-Komplex,
8,0 ml einer Spurenelementlösung folgender Zusammensetzung: 150 mg HBO_3,
100 mg $MnSO_4 \cdot 5H_2O$,
4 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$,
1 mg $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$,
ad 1000 ml 0,02 n H_2SO_4;
ad 1000 ml aqua dest..
Die Algen wurden jeden Tag mit frischer Nährlösung verdünnt und auf eine Zelldichte von ca $1{,}5 \cdot 10^6$ Zellen pro ml eingestellt.

2122 Kulturbedingungen.

Als Kulturgefäße dienten die oben beschriebenen Kulturflaschen, die aber in einem Wasserbad hingen, das mit einem Thermorührer constant auf 30° C gehalten wurde. Die Anlage wurde mit Leuchtstoffröhren (TL 40 W, weiß, der Fa. Phillips) so beleuchtet, daß an der Oberfläche der Kulturkolben eine Beleuchtungsstärke von 6 - 10 000 Lux herrschte. Da unter diesen Bedingungen der CO_2-Gehalt der Luft der begrenzende Faktor für das Wachstum der Algen ist, wurden der durchperlenden Luft noch 3 % CO_2 beigemischt. Diese Bedingungen sind so optimal, daß durch einen rhythmischen Licht-Dunkel-Wechsel eine fast vollständige Synchronisation erreicht wird. Die Algen erhielten 14 h Licht (8^{00} bis 22^{00} Uhr) und 10 h Dunkel (22^{00} bis 8^{00} Uhr) am Tag. In dieser Zeit durchliefen sie einen vollständigen Entwicklungszyklus und vermehrten sich dabei auf das 5- bis 7-Fache.

22 Methodik der Versuche.

221 Anzucht der Algen für die Versuche.

2211 Schwachlichtalgen für die ^{32}P-Einlagerungsversuche.

5 Tage vor einem Versuch bekamen die aus der Stammkultur entnommenen Algen frische, phosphathaltige Nährlösung. Hieraus wurden sie drei Tage vor dem Versuch in neue, phosphatfreie Nährlösung umgesetzt und die Zelldichte so eingestellt, daß sie am Versuchstag ca 1,4 - 1,8 Mill. Zellen / ml betrug. Die Algen wurden dazu, wie üblich, in einer Thoma-Zählkammer gezählt. Diese Phosphatverarmung ist notwendig, da Versuche mit nicht verarmten Algen gezeigt haben, daß die Phosphataufnahme und die Einlagerung in die organischen Phosphorverbindungen in Kurzzeitversuchen zu gering sind (UREACH 1961). Diese 72 h dauernde Verarmung ist aber unter den Bedingungen

der Schwachlichtkultur völlig ungefährlich und ergibt keine ausgesprochenen Mangelkulturen (SIMONIS 1956; SIMONIS und KATING 1956). 15 bis 16 h vor dem Versuch, am Abend vorher, wurden die Algen verdunkelt. Eine Vorverdunklung von mehr als 12 h erhöht nämlich, wie MOSTAFA (1960) zeigte, die Phosphataufnahme und den Einbau in die organisch-lösliche Phosphatfraktion im Licht. Bei mehr als 24 h Vorverdunklung sinkt aber die Gesamtaufnahme wieder ab (MOSTAFA 1960). Waren die Algen vor dem Versuch, während der Phosphatverarmung, zu stark gewachsen, so mußten sie vor dem Versuch noch verdünnt werden. Dabei erhielten sie gleichzeitig noch etwas frische Nährlösung. Die dadurch bessere Nitratversorgung wirkte sich auch auf die Phosphateinlagerung aus (SANTARIUS unveröff.). Für die Einlagerungsversuche wurde die jeweils benötigte Menge dieser Suspension direkt in die Küvetten pipettiert.

2212 Schwachlichtalgen für die Glykolsäure-Aufnahmeversuche.

Die Anzucht der Algen für die Glykolsäure-Aufnahmeversuche erfolgte genau so wie für die ^{32}P-Aufnahmeversuche mit Schwachlichtalgen. Vor dem Versuch mußte jedoch das in der Nährlösung enthaltene Nitrat entfernt werden, da es die Bestimmung der Glykolsäure stört (Vgl. Abs. 2262). Damit während der Versuche kein Nitratmangel auftrat, bekamen die Algen am Abend vor dem Versuch noch 0,2 g KNO_3 pro 500 ml Suspension geboten.
Unmittelbar vor dem Versuch wurden die Algen abzentrifugiert, in nitrat- und phosphatfreier Nährlösung aufgeschwemmt, nochmals abzentrifugiert und entgültig in dieser Nährlösung suspendiert. Diese Nährlösung war nach SANTARIUS (pers. Mitteilung) folgendermaßen zusammengesetzt:

0,450 g KCl,
0,100 g $MgSO_4.7H_2O$,
0,062 g $CaCl_2.2H_2O$,
0,001 g $FeCl_3.6H_2O$,
1 ml A-Z-Spurenelementlösung nach Hoagland,
ad 1000 ml aqua dest..

Eine Wirkung des "Nitratmangels" nach dieser kurzen Zeit ist wohl nicht anzunehmen. KANLDER (1954) fand einen Einfluß des Nitratmangels bei Chlorella erst nach einem Tag im Dunkeln und anschließender 1 - 2 h dauernder Glucoseaufnahme. Hierbei war der N-Mangel offenbar auf das starke Wachstum der Algen aufgrund der Glucosefütterung zurückzuführen.
30 bis 45 min nachdem die Algen nitratfrei gesetzt waren, wurden die Versuche begonnen. Während der ganzen Zeit, auch während des Abzentrifugierens, waren die Algen verdunkelt.

2213 Synchronalgen für die ^{32}P-Einlagerungsversuche.

Zur Verarmung wurden die Algen abzentrifugiert und in einem phosphatfreien Medium aufgeschwemmt, das alle Bestandteile der normalen Nährlösung (vgl. Abs. 2121) bis auf die Phosphate enthielt. Als Ersatz für die fehlende Pufferwirkung der Phosphate wurde die Nährlösung mit K-Phthalatpuffer ($2{,}38 \cdot 10^{-3}$ mol Endkonzentration) auf pH 5,6 gepuffert. Nach 4 h phosphatfreien Wachstums (von 8^{00} bis 12^{00} Uhr) - diese Zeit genügte unter den Bedingungen der Starklichtkultur völlig - wurden die Algen vor dem Versuch noch für 1 h verdunkelt.
Für einige Versuche wurden die Algen auch schon am Tag vor dem Versuch verarmt. Dazu wurden sie gegen 18.30 Uhr phosphatfrei gesetzt. Sie bekamen dann noch 3 1/2 h Licht und anschließend 10 h Dunkel, wie im Verlauf der normalen Kultur. Am nächsten Morgen erhielten sie noch ca 1 h Licht - durch diesen "Lichtschock" teilten sich auch die Zellen, die noch nicht

restlos in Autosporen zerfallen waren -. Danach blieben die Algen bis zum Versuch verdunkelt.
Um bei den Versuchen immer möglichst gleiche Algensuspensionen zu haben, wurden die Algen nach einer vorläufigen Chlorophyllbestimmung vor Versuchsbeginn auf etwa 3 /ug Chlorophyll / ml eingestellt.

2214 Mit $^{32}PO_4^{---}$ vormarkierte Synchronalgen.

Hierzu wurden die Algen am Vortage bereits um 14.00 Uhr in das phosphatfreie Medium umgesetzt. Nach 4 h Verarmung wurde das $^{32}PO_4^{---}$ als trägerfreie Phosphorsäure zugegeben. Nach 60 min - in dieser Zeit hatten die Algen praktisch die gesamte Aktivität aufgenommen - wurden sie abzentrifugiert und in frischer, P-freier Nährlösung aufgeschwemmt. Nach weiteren 30 bis 45 min im Licht wurden sie in die Einlagerungsküvetten pipettiert und verblieben dort über Nacht verdunkelt bis zum Versuch. (N. GIMMLER, pers. Mitteilg.)
Die Algen teilten sich bei dieser Anordnung noch nach der Markierung mit ^{32}P, das so sehr gleichmäßig in den Zellen verteilt wurde. Obwohl eine restlose Gleichmarkierung der Algen hierbei noch nicht erreicht wird, sind doch alle Fraktionen so markiert, daß sich während der Versuche keine Veränderungen (außer den beim Versuch induzierten) mehr ergeben.

2215 Synchronalgen für die Glucoseaufnahme-Versuche.

Diese Algen wurden genau so angezogen und P-verarmt wie die Synchronalgen für die Kurzzeiteinlagerungsversuche (vgl. Abs. 2213).

222 B e n u t z t e A p p a r a t u r e n .

2221 Einlagerungsapparatur.

Während der aktiven (Einlagerungs-)Versuche wie auch bei den Substrat-Aufnahmeversuchen befanden sich die

Algen in einer G l a s k ü v e t t e , die einem verkleinerten und mit einem Wassermantel versehenen "Lollipop" (CALVIN 1955; URBACH 1961) entsprach. Diese Küvette faßte ca 20 ml. Ein eingeschliffenes Glasrohr verschloß die obere Öffnung. Es enthielt auch die Kapillare für die Belüftung. Durch einen Schliffhahn am unteren Ende konnte die Suspension sehr schnell abgelassen werden. Zwischen den doppelten, parallelen Wänden der Küvette strömte Wasser, das ein Ultrathermostat "Höppler" ständig umwälzte und auf konstanter Temperatur hielt ($\pm$0,1° C). Das Wasser erwärmte den Küvetteninhalt, gleichzeitig filterte es die Wärmestrahlung der Lampen ab. Durch diese Anordnung war die für das Arbeiten unerläßliche Temperaturkonstanz weitgehend gewährleistet.

Für die Beleuchtung während der Versuche sorgten Reuterlampen (6V, Fa. Phywe, Göttingen), die durch Verwendung spezieller Linsen annähernd paralleles Licht abgaben. Ihr Querschnitt war etwa so groß wie die Seitenwände der Küvetten, so daß diese sehr gut ausgeleuchtet wurden. Die Beleuchtungsstärke jeder Lampe betrug in 4 cm Entfernung (=Abstand der Küvettenoberfläche) 10^4 Lux (Die Absorption des Wassermantels ist hierbei allerdings nicht berücksichtigt). Die Lampen und die Küvetten waren auf einer optischen Bank montiert.

In der Küvette wurde die Algensuspension durch die oben erwähnte Kapillare belüftet. Für die Versuche diente Preßluft ($\pm$ 1,5 % CO_2) als Begasung. Der Luftstrom sorgte auch für eine gleichmäßige Durchmischung der Suspension in der Küvette. Die Luft wurde vor dem Eintritt in die Küvette in einer Waschflasche mit Sublimatlösung entkeimt und in angesäuertem Wasser erwärmt und angefeuchtet. Beim Arbeiten ohne CO_2 wurden zwei Waschflaschen mit KOH (10 und 5 %-ig) vorgeschaltet.

2222 Warburg-Apparat.

Ein Warburg-Apparat wurde für bestimmte Substrat-Aufnahmeversuche benutzt, wenn sehr viele Proben mit langer Einlagerungszeit und verschiedenen Ansätzen nötig waren. In diesem Fall wurde in den Suspensionen nur der verbliebene Rest des Substrates bestimmt. Manometrische Messungen wurden bei dieser Arbeit nicht gemacht.

2223 Meßapparate für ^{32}P.

Die radioaktiven Lösungen wurden in gläsernen Meßschälchen mit 10 bzw. 1 ml Fassungsvermögen gemessen. Dazu dienten entweder ein Glockenzählrohr FHZ 15 c der Fa. Frieseke und Höpfner, Erlangen, oder ein Methandurchflußzählrohr FH 407 A. Sie waren an ein Strahlenmeßgerät FH 49 oder FH 90 der gleichen Fa. angeschlossen. Die Aktivitäten wurden immer so gewählt, daß eine Totzeitkorrektur der erhaltenen Werte nicht nötig war, u. U. wurden die Lösungen verdünnt. Mit Hilfe eines Uranoxyd-Standardpräparates wurde die Geometrie der Anordnung bei jeder Meßreihe überprüft.

2224 pH-Meter.

Für die pH-Messungen diente ein pH-Meter der Type F 196 (Fa. Metrohm, Herisau, Schweiz). Für die Messungen wurde es jeweils mit einer Standard-Pufferlösung geeicht.

2225 Photometer.

Für die verschiedenen kolorimetrischen Bestimmungen dienten folgende Photometer:

a) Elco III der Fa. Carl Zeiss für die Glykolsäurebestimmung.
b) Eppendorf-Photometer für die Bestimmung der Glucose und des inaktiven Phosphats ($^{31}PO_4^{---}$).
c) Spectralphotometer M 4Q der Fa. Carl Zeiss für die Chlorophyllbestimmungen.

223 F ü r d i e V e r s u c h e v e r w e n d e t e R e a g e n z i e n .

2231 Radioaktive Phosphorsäure ($H_3{}^{32}PO_4$).

Das ^{32}P lieferte die Kernreaktor Bau- und Betriebsgesellschaft m. b. H., Karlsruhe, als trägerfreie Orthophosphorsäure in verdünnter Salzsäure, später die Farbwerke Höchst AG, Höchst. Für die Versuche wurde die Lösung mit aqua dest. auf die gewünschte Aktivität verdünnt. Durch 10 min Kochen konnte die Lösung z. T. sterilisiert und ein Teil der vorhandenen, kondensierten Phosphate hydrolysiert werden.

2232 Inaktives Orthophosphat ($H_3{}^{31}PO_4$).

Bei vielen Versuchen erhielten die Algen mit dem radioaktiven Phosphat noch eine bestimmte Menge inaktiven Phosphates. Hierzu diente eine Lösung von KH_2PO_4 in Wasser (Fa. Merck AG, Darmstadt.).

2233 Glykolsäure.

Die kristallisierte Substanz (purum) lieferte die Fa. Fluka (Buchs SG., Schweiz). Wegen der Flüchtigkeit wurde die Lösung für jeden Versuch frisch angesetzt. Wenn nicht anders angegeben, enthielt die Lösung nur reine, n i c h t n e u t r a l i s i e r t e Glykolsäure.

2234 Glucose.

Die D-Glucose wurde als Monohydrat von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen. Da die verwendeten Glucoselösungen auch im Kühlschrank nicht lange haltbar waren, wurden sie für jeden Versuch frisch angesetzt.

2235 2-Desoxyglucose.

Diese Substanz lieferte die Fa. Sigma Chemicals Co., St. Louis, Missouri, USA. Die Lösungen wurden äquimolar zu den Glucoselösungen angesetzt.

2236 Hemmstoffe:

Uranylnitrat: ($UO_2(NO_3)_2.6H_2O$) Es diente nach ROTHSTEIN (1954), sowie STEVENINCK und ROTHSTEIN (1965) zur Blockierung der Polyphosphate bei der Glucoseaufnahme. Das Nitrat hatte gegenüber dem sonst häufiger verwendeten Azetat den Vorzug, daß keine weitere organische Substanz zugegeben wurde, während Nitrat sowieso in der Nährlösung enthalten war.

DCMU, Diuron: (3-(3,4-Dichlor-phenyl)-1,1-Dimethyl-Harnstoff; Fa. Bayer, Leverkusen, Pflanzenschutzabteilung). Der Hemmstoff wurde in methanolischer Lösung stets zusammen mit Antimycin A zugegeben. DCMU ist ein vielbenutzter Hemmstoff der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung. Er blockiert den nichtzyklischen Elektronentransport (VERNON und ZAUGG 1960). Nach SIMONIS (1966), sowie URBACH und SIMONIS (1964) gilt dies auch für intakte Pflanzenzellen.

Antimycin A: (Serva Entwicklungslabor, Heidelberg) Es wurde, wie erwähnt, zusammen mit DCMU zugegeben. Es blockiert den Elektronentranport bei der Atmung und, zusammen mit DCMU, bei intakten Pflanzenzellen auch den zyklischen Elektronentransport der Photosynthese (SIMONIS 1966; URBACH und SIMONIS 1964).

2237 Trichlor-Essigsäure (TCE).

Die Trichlor-Essigsäure (Fa. Merck, Darmstadt), im folgenden TCE abgekürzt, diente zum Abtöten und Extrahieren der Algen. Die Lösung war immer 10 %-ig.

2238 Pufferlösungen:

Ein konstanter und genau definierter pH-Wert ist für die ^{32}P-Einlagerung und die Verteilung auf die ein-

zelnen Fraktionen sehr wichtig, wie JACOBI (1959) festgestellt hat. Die Algen wurden bei den Einlagerungsversuchen deshalb stets gepuffert. Dazu dienten:

Tris-Puffer: (Tris-hydroxymethyl-aminomethan; Fa. Serva, Heidelberg) Die 0,5 mol Lösung (Endkonzentration in der Küvette 0,05 mol) wurde mit konz. Schwefelsäure oder konz. Salzsäure auf pH 8,0 eingestellt.

Phthalat-Puffer: (Kaliumhydrogen-Phthalat; Fa. Merck, Darmstadt). Die Lösung wurde mit KOH auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Die Endkonzentration betrug meist $2{,}38 \cdot 10^{-3}$ mol.

224 Ausführung der Versuche mit markiertem Phosphat.

2241 Einlagerungsversuche mit Schwachlichtalgen.

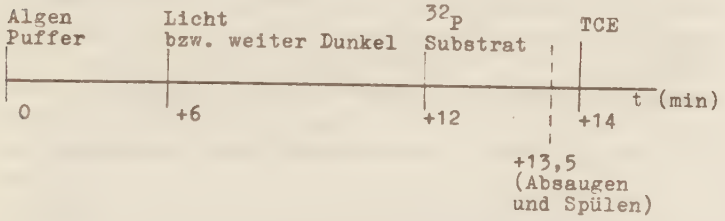
Für die Einlagerungsversuche wurden von der verdunkelten und phosphatverarmten Algensuspension jeweils 10 ml in die Einlagerungsküvetten pipettiert und durch Zugabe einer Pufferlösung auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Nach 6 min Zeit für die Adaptation, die Erwärmung und die Durchmischung der Suspension wurden die Algen belichtet, die Dunkelkontrollen blieben weiterhin im Dunkeln. Nach weiteren 6 min, d. h. nach Ende der Induktionsphase der Photosynthese (WEICHART 1961), wurde die Aktivität, evtl. zusammen mit anderen Lösungen, hinzugefügt.

30 sec vor Beendigung der Einlagerung wurde die Suspension auf eine mit zwei Blaubandfiltern (Fa. Schleicher und Schüll) bespannte Filternutsche (Stefi-Filtergerät der Membranfiltergesellschaft, Göttingen) abgelassen. Die Einlagerungslösung wurde sofort abgesaugt und die auf dem Filter zurückbleibenden Algen zwei Mal mit Wasser gewaschen. Dadurch konnte noch der größte Teil des adsorbierten ^{32}P entfernt werden (LATIES 1959). Genau nach Ablauf der

Einlagerungsdauer wurden die Algen mit 3 ml gekühlter (0° C) TCE abgetötet.
Ein Schema soll Anlage und Verlauf eines Versuches verdeutlichen:

Versuchsansatz: 10,0 ml Algensuspension,
1,5 ml Pufferlösung,
1,5 ml Substratlösung
2,0 ml ^{32}P-Einlagerungslösung
1,0 Mill. IpM, 12,9 . 10^{-6} mol an inaktivem Phosphat.
15,0 ml

Belüftung: Luft + 1,5 % CO_2,
Temperatur: 25° C,
Beleuchtungsstärke: 2 x 10^4 Lux,
Einlagerungsdauer: 2 min,
Versuchsablauf:



2242 Einlagerungsversuche mit Synchronalgen.

Diese Versuche wurden genau wie die Versuche mit Schwachlichtalgen ausgeführt (vgl. vorstehenden Abs.). Die Versuchsalgen wurden allerdings ständig im Ultrathermostaten bei 30° C gehalten. Bei dieser Temperatur wurden auch die Versuche ausgeführt. Da diese Algen noch während der P-Verarmung stark wuchsen, wurden sie vor dem Versuch auf eine Suspensionsdichte von 3 µg Chlorophyll / ml eingestellt (vgl. Abs. 2213).

2243 Versuche mit ^{32}P-vormarkierten Synchronalgen.
Bei diesen Versuchen kamen die Algen schon nach der

Verdunkelung am Abend des Vortages in die Küvetten, in denen dann die Versuche ausgeführt wurden (Hierzu wurden größere Küvetten mit 60 ml Fassungsvermögen benutzt)(Vgl. Abs. 2214). Die Algen in der "Lichtküvette" wurden vor Versuchsbeginn 1 h belichtet, die Dunkelkontrollen blieben die ganze Zeit über im Dunkeln. Nachdem 30 und 1 min vor Substratzugabe (=Versuchsbeginn) Kontrollproben entnommen worden waren, (bei den belichteten Algen auch 1 min vor dem Einschalten des Lichtes), erhielten die Algen das Substrat, bzw. die Hemmstoffe. Anschließend wurden in bestimmten Abständen mit einer Kolbenpipette die Proben (meist 4,0 ml der Suspension) entnommen. Diese wurden dann wie bei den anderen Versuchen (Vgl. Abs. 2241) abgesaugt, nachgewaschen und extrahiert. Da sich die Algen in den beiden Küvetten vor und während des Versuches sehr unterschiedlich entwickelten, wurden aus jeder Küvette noch 2 x 10 ml Suspension entnommen und darin der Chlorophyllgehalt bestimmt. Dieser diente als Bezugswert für die Berechnung.

225 Extraktion und Fraktionierung.

2251 Abtöten und Extraktion mit TCE.

Nach dem Abtöten wurden die Filternutschen auf Absaugstutzen gesetzt. Drei Mal im Abstand von je 10 min wurde die TCE abgesaugt und durch frische ersetzt. Zuletzt wurde noch mit TCE, 3 und 2 ml Wasser nachgewaschen. Hierbei werden die säurelöslichen organischen Phosphorverbindungen praktisch quantitativ extrahiert. Die Extrakte wurden in den Absaugstutzen gesammelt und aus diesen in Schliffkolben (50 oder 25 ml) übergespült. Um eine saure Hydrolyse der Extrakte zu verhindern, wurden sie sofort mit Ammoniak gegen Universalindikator (Fa. Merck) neutralisiert. Dann wurde bis zur Marke auf-

gefüllt. Eine Kühltruhe hielt die Filternutschen, die Extrakte und die TCE ständig auf 0° C.

2252 Aufarbeitung der TCE-Extrakte aus den Versuchen ohne Auftrennung des Pu.

Bei diesen Versuchen wurden die Extrakte nur in das anorganische Orthophosphat (Pa) und in das organisch-TCE-lösliche Phosphat (Po) aufgetrennt. Das TCE-unlösliche organisch-gebundene Phosphat (Pu) wurde ohne weitere Auftrennung bestimmt.

22521 Gesamtlösliches Phosphat (GlP):

Die Messung der Radioaktivität in den TCE-Extrakten ergab die Menge an säurelöslichen, organischen Phosphorverbindungen und an anorganischem Orthophosphat zusammen (Pa + Po).

22522 TCE-lösliches, organisches Phosphat (Po):

Die Abtrennung und Bestimmung des säurelöslichen, organisch gebundenen Phosphates wurde im Verlauf der Untersuchungen nach verschiedenen Methoden durchgeführt.

Fällung des Pa als NH_4MgPO_4 nach REICHART: Die Trennung des Pa vom Po wurde in 20 ml des TCE-Extraktes in 25-ml-Kölbchen ausgeführt, wobei das Pa als Magnesium-Ammonium-Phosphat ausgefällt wurde. Da die Menge des in der Lösung vorhandenen Orthophosphates aber nicht für eine Fällung ausreichte, mußte inaktives Trägerphosphat (1 ml einer 0,01 mol Na_2HPO_4-Lösung) zugegeben werden. Zur Fällung diente 1 ml einer sauren Magnesiamixtur (5 g $MgCl_2.6H_2O$ + 10 g NH_4Cl in 100 ml aqua dest.; Die Lösung war mit HCl gegen Methylorange schwach angesäuert). Da das NH_4MgPO_4 nur in stark alkalischem Milieu ausfällt, wurden 10 min später

noch 1 ml konzentrierte Ammoniaklösung einpipettiert, dann wurde aufgefüllt und umgeschüttelt.

Bei dieser Methode fällt trotz des zugegebenen Trägerphosphates nicht alles Pa aus. Zwar könnte man durch höhere Konzentrationen der Fällungsreagenzien das anorganische Phosphat noch vollständiger ausfällen, da so das Löslichkeitsprodukt noch weiter herabgedrückt wird. Dies würde aber den Fehler wegen der Adsorption der gelösten Verbindungen am Niederschlag nur vergrößern. Durch geeignete Konzentrationen der Reagenzien läßt sich aber erreichen, daß ebenso viel organisch-gebundenes ^{32}P mit ausfällt, wie Pa in Lösung bleibt. Die beiden Fehler heben sich dann gegenseitig auf (WEICHART 1959).

Nachdem die Reagenzien zugefügt waren, blieben die Kolben noch 12 h bei 0° C stehen, bevor der Niederschlag abfiltriert wurde. Die Radioaktivität in 10 ml des Filtrates ergab die Menge des TCE-löslichen, organische-gebundenen radioaktiven Phosphates.

Extraktion des Pa als Molybdatkomplex nach AVRON (1960)

Zu 1 ml der zu bestimmenden Lösung wurden in einem Reagenzglas 1 ml Azeton und nach Umschütteln 1,5 ml Isobutanol-Benzol-gesättigtes Wasser und 7,0 ml wassergesättigtes Isobutanol-Benzol-Gemisch pipettiert. Nach der Trennung der Phasen wurden 0,8 ml Ammoniummolybdatlösung (5 g Ammoniummolybdat in 100 ml 4 n H_2SO_4) zugegeben. Nach 5 min wurde 30 sec kräftig durchgemischt und nach der Trennung der Phasen die Isobutanolphase abgesaugt. Zur wässrigen Phase wurden dann 2 Tropfen 0,02 mol KH_2PO_4-Lösung und 7 ml wassergesät-

tigtes Isobutanol-Benzol gegeben und das ganze nochmals 30 sec kräftig gemischt. Nach der Trennung der Phasen wurde die obere (=Isobutanol-) Phase wiederum abgesaugt.
Von der erhaltenen Lösung wurde 1 ml gemessen. Zur Umrechnung auf das ursprüngliche Volumen mußte der Meßwert mit 3,3 multipliziert werden.

Bestimmung des Po nach YANAGITA (1960, 1964):

a) Bestimmung des Po:
In ein kalibriertes Schliffreagenzglas wurden nacheinander einpipettiert:
5,0 ml der zu bestimmenden Probe,
0,8 ml 1 n Schwefelsäure,
1,2 ml n/100 Ammoniummolybdatlösung,
5,0 ml wassergesättigtes Isobutanol-Benzol.
Nach 15 sec Umschütteln wurde das Volumen der unteren Phase abgelesen und die obere (=Isobutanol-) Phase abgesaugt. Dann wurde nochmals mit 2 ml Isobutanol-Benzol nachgewaschen. Die Messung ergab, nach Umrechnen auf das ursprüngliche Volumen, das Po.

b) Bestimmung des stabilen und labilen TCE-löslichen organischen ^{32}P:
5 ml der wässrigen (unteren) Phase wurden in einem neuen Schliffreagenzglas mit 0,5 ml 10 n H_2SO_4 versetzt, umgeschüttelt und das ganze 10 min im Wasserbad gekocht. Nach dem Abkühlen wurden 1,0 ml M /10 Ammoniummolybdatlösung und 5,0 ml Isobutanol-Benzol einpipettiert. Nach 15 sec Schütteln wurde das Volumen der unteren Phase abgelesen und die obere Phase abgesaugt. In der wässrigen Phase verblieben das säurestabile Phosphat, vor allem Zuckerphosphate und das stabile Nucleotid-Phosphat. Das extrahierte, labile, ^{32}P

ließ sich durch die Subtraktion Po - Po_{stabil} berechnen. Es enthält vor allem die labilen Zuckerphosphate und das labile (energiereiche) Nucleotid-Phosphat, daneben geringe Mengen von Poly-Phosphat "A".

22523 Anorganisches Orthophosphat (Pa):

Die Menge des anorganischen Orthophosphates ergab sich bei allen Bestimmungen aus der Differenz von gesamtsäurelöslichen ^{32}P zu organisch-gebundenem ^{32}P (GlP - Po).

2253 Bestimmung des TCE-unlöslichen ^{32}P (Pu):

Bei der Extraktion der Algen mit TCE blieb immer ein beträchtlicher Teil des ^{32}P in den Algen auf dem Filter zurück. Sofern die Algen nicht mit anderen Lösungsmitteln weiter extrahiert wurden (vgl. Abs. 2254), wurden die Filter in Veraschungskolben (Mikrokjeldahlkolben, 20 ml) mit H_2SO_4 conc. und 30 %igem H_2O_2 feucht verascht. Dabei blieb das Phosphat in der beim Eindampfen zurückbleibenden Schwefelsäure gelöst. Die Lösung wurde in Meßkolben übergespült, aufgefüllt und gemessen.

2254 Extraktion zur weiteren Auftrennung des Pu:

Bei einem Teil der Versuche mit vormarkierten Algen wurden die nach der TCE-Extraktion auf dem Filter verbliebenen P-Verbindungen (Pu) noch weiter extrahiert und aufgetrennt (nach MIYACHI und KANAI, verändert nach ULLRICH im Druck):

22541 Alkohol-Äther-Extraktion:

Zur Extraktion der Lipoide mit den darin enthaltenen ^{32}P-Verbindungen wurden die Filter in 15 ml Äthanol-Äther-Gemisch (im Verhältnis 2:1) 10 min lang am Rückflußkühler gekocht. Anschließend kamen die Filter wieder auf die "Stefis", wo mit 96 %igem Äthanol

nachgewaschen wurde. Die Lösungen wurden in 50-ml-Schliffkolben gesammelt, aufgefüllt und direkt gemessen.

22542 Glycinpuffer-Extraktion:

Zur weiteren Extraktion diente Glycinpuffer (pH 9,0), mit dem die Algen 2 h bei 0° C extrahiert wurden. Er war folgendermaßen zusammengesetzt:
12 ml 0,1 n NaOH (1,2 ml 1 n NaOH) zu 88 ml Glycin-NaCl-Gemisch (7,505 g Glycin und 5,85 g NaCl in 1 l Wasser), eingestellt auf pH 9,0 und auf 100 ml aufgefüllt.

22543 NaOH-Extraktion:

Anschließend wurden die Filter in Bechergläsern mit 10 ml 1 n NaOH zunächst bei 0° C über Nacht und dann nach Erneuerung des Extraktionsmittels bei 37° C 8 h lang extrahiert. Die Extrakte und das zum Nachwaschen benutzte Wasser wurden vereinigt, in Meßkolben übergespült, neutralisiert und aufgefüllt.

22544 Rest-P:

Das noch auf den Filtern verbliebene ^{32}P wurde nach feuchter Veraschung (vgl. Abs. 2253) bestimmt.

2255 Weitere Auftrennung der erhaltenen Fraktionen:

Die durch die TCE-, Glycinpuffer- und NaOH-Extraktion gewonnenen Lösungen wurden noch weiter aufgetrennt. Dazu dienten:

22551 Bestimmung des Pa und Po (stabil und labil):

Dies geschah, wie auch bei den anderen Versuchen, nach der Methode von YANAGITA (vgl. Abs. 2252).

22552 Bestimmung der Nucleotide:

Zur Bestimmung der Nucleotide diente die Adsorption an Aktivkohle. Dazu wurden in ein 10-ml-Zentrifugenglas 5,0 ml des Extraktes und 1,0 ml Wasser, in dem

50 mg Aktivkohle suspendiert waren, pipettiert. Die erhaltene Suspension blieb 1 h bei 0° C stehen, wobei sie öfters umgerührt wurde. Dann wurde abzentrifugiert und zwei Mal mit 2,0 ml Wasser nachgewaschen. Die Extrakte wurden vereinigt und auf 10 ml aufgefüllt.
Die in den Zentrifugengläsern zurückbleibende Kohle wurde mit 2,0 ml Wasseraufgenommen. 1 ml davon wurde in Metallschälchen pipettiert, getrocknet und die darin enthaltene Radioaktivität bestimmt.

22553 Bestimmung der Polyphosphate im Ba-Niederschlag

In ein 25-ml-Zentrifugenglas wurden zu 5,0 ml der Probe 0,5 ml 3 %ige Grahamsalzlösung, 2,0 ml 2 n Na-Azetatpuffer pH 4,0 und nach dem Umschütteln 2,0 ml gesättigte $BaCl_2$-Lösung pipettiert. Nach einer Nacht im Kühlschrank wurde kalt abzentrifugiert, mit 1,5 ml 0,5 n Azetatpuffer pH 4,0 und 1 Tropfen gesättigter $BaCl_2$-Lösung zwei Mal nachgewaschen. Der gesammelte Überstand wurde auf 14 ml aufgefüllt und seine Aktivität bestimmt. Der Niederschlag wurde mit 3,0 ml 1 n HCl im kochenden Wasserbad gelöst, in 10-ml-Schliffkolben übergespült, aufgefüllt und das darin enthaltene ^{32}P gemessen.

226 Substrataufnahme-Versuche

2261 Untersuchung der Glykolsäureaufnahme.

Bei diesen Versuchen sollten die Bedingungen denen der ^{32}P-Einlagerungsversuche möglichst ähnlich sein. Anders als bei den ^{32}P-Einlagerungsversuchen wurde hierbei jedoch K-Phthalatpuffer (pH 4,3) benutzt, da Glykolsäure als freie, undissoziierte Säure (also im sauren Bereich) gegenüber dem Glykolat-Ion viel besser aufgenommen wird (MYERS 1948; TOLBERT und COHAN 1955; MILLER und Mitarb. 1963). Die Algen wurden in die 60-ml-Küvetten pipettiert, die Pufferlösung zu-

gefügt und nach einigen Minuten Dunkelheit zur Adaptation wurde belichtet, die Kontrollen blieben weiter im Dunkeln. Nach Beendigung der Induktionsphase wurde die Glykolsäure zugefügt.
Für die Bestimmung der Glykolsäure im Medium wurde immer ein Teil der Suspension abgelassen und auf einem "Stefi" abgesaugt. 4 ml des Filtrates wurden in 1 ml 10 H_2SO_4 pipettiert, so daß die Endkonzentration an Schwefelsäure 2 n betrug. Für die Bestimmung wurden von der so erhaltenen Lösung zwei Mal je 0,5 ml entnommen und dazu 5 ml des Reagenz pipettiert. Als Leerwert für die kolorimetrische Bestimmung diente eine vor der Glykolsäurezugabe entnommene Probe.

2262 Bestimmung der Glykolsäure.

Die Glykolsäure wurde kolorimetrisch nach EEGRIWE (1932) bzw. CALKINS (1943) bestimmt. Als Reagenz diente eine Lösung von 0,01 g 2,7-Dihydroxy-Naphtalin in 100 ml konzentrierter Schwefelsäure. Das Reagenz wurde nach WARBURG (1960) für jeden Versuch frisch angesetzt. Die zu bestimmende Lösung sollte ca 2 n an Schwefelsäure sein und nicht mehr als 50 µg Glykolsäure / ml enthalten. Zu 0,5 ml dieser Lösung wurden im Eisbad 5,0 ml des Reagenz unter ständigem Umschütteln pipettiert und anschließend nochmals kräftig durchgeschüttelt. Die erhaltene Lösung wurde im Brutschrank bei 90° C 3 1/2 h erhitzt. Es entstand dabei eine rotviolette Färbung, die bei 530 mµ im Elco III kolorimetrisch bestimmt wurde. Die für die Ermittlung der Werte nötige Eichkurve ist in Abb. 1, S. 24, dargestellt.
Die dieser Bestimmung zugrunde liegende Reaktion ist noch nicht restlos aufgeklärt. Die Farbe rührt nach CALKINS (1943) daher, daß sich Formaldehyd, das von der Glykolsäure abgespaltet wird, und das

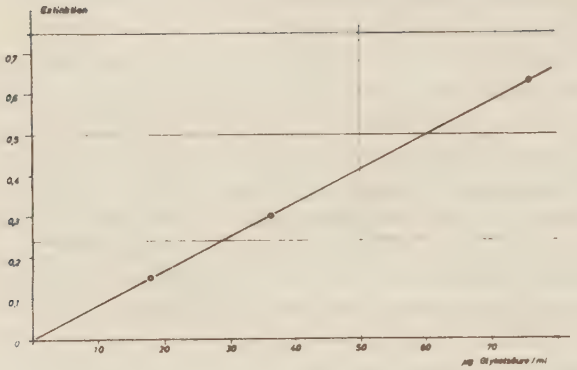


Abb. 1: Eichkurve für die Glykolsäurebestimmung.

1,1-Dihydroxynaphtalin zu Tetrahydroxynaphtylmethan kondensieren. Diese farblose Substanz geht dann beim Erhitzen stufenweise in den tiefroten Farbstoff über, wobei vermutlich chinoide Systeme eine Rolle spielen. Diese Reaktion wird durch keine der gewöhnlichen organischen Säuren wie Ameisen-, Essig-, Oxal-, Bernstein-, Wein-, Zitronen-, Glyoxyl-, benzoe-, und Phthalsäure gestört. Von den anorganischen Ionen stört Nitrat, das mit dem Reagenz eine grüne Färbung ergibt, es wurde deshalb vorher entfernt (Vgl. Abs. 2212). Da die Bestimmung zwischen 5 und 50 µg / ml die genauesten Werte liefert, wurde im Bereich unter 50 µg / ml gearbeitet.

2263 Glucose-Aufnahme-Versuche.

Diese Versuche wurden in der Regel wie die Glykolsäureaufnahme-Versuche durchgeführt, lediglich mit

Synchronalgen und bei 30° C. So daß auch hier Bedingungen vorlagen, die denen der entsprechenden ^{32}P-Einlagerungsversuche möglichst ähnlich waren. Die Bestimmung der Glucose erfolgte, wie auch die der Glykolsäure, im Medium. Eine vor der Glucosezugabe entnommene Probe diente als Leerwert.

2264 Die Bestimmung der Glucose.

Zur Bestimmung der Glucose diente die Bestimmung von FOLIN und WU (1922), in der Abwandlung von KANDLER (1954). Die für die Bestimmung benötigten Reagenzien lieferte die Fa. Merck, Darmstadt. Zu 1 ml der zu untersuchenden Lösung wurden 2 ml der Lösung A, alkalisches Kupferreagenz, gegeben, und die Lösung dann 6 min im kochenden Wasserbad

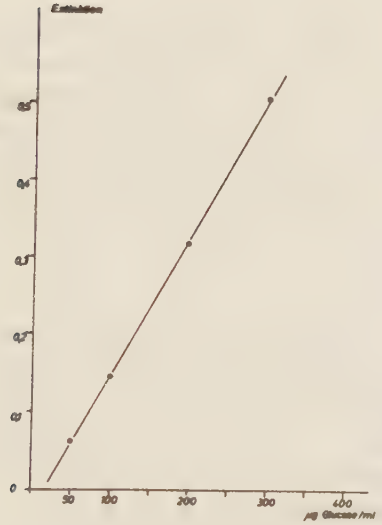


Abb. 2: Eichkurve für die Glucosebestimmung nach FOLIN und WU.

erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 2 ml der Lösung B, Molybdänsäurereagenz, zugesetzt und umgeschüttelt. Nach 10 min Wartezeit wurde die Lösung mit Wasser auf 25 ml verdünnt und anschließend bei 578mμ kolorimetrisch bestimmt. Die Farbe rührt hier, wie bei der Phosphatbestimmung, von einem blauen Molybdatkomplex her. Die für die Bestimmung benötigte Eichkurve ist in Abb. 2, S. 25, dargestellt. Da unterhalb von 40 μg / ml die Bestimmung nicht mehr genau war, wurde darauf geachtet, daß nicht weniger als 50 μg / ml in den zu bestimmenden Lösungen enthalten waren. Die Konzentration in den Versuchsansätzen betrug in der Regel 150 μg / ml.

23 Weitere Bestimmungen zu den Versuchen.

2301 Trockengewicht.

Für einen Teil der Versuche diente das Trockengewicht der Algen als Bezugsgröße für die Berechnung der Ergebnisse. Für die Bestimmung wurden je 50 ml der Suspension entnommen und, wie oben beschrieben, auf einem mit einem gewogenen Filter bespannten "Stefi" abgesaugt und nachgewaschen. Das Filter wurde dann bei 105° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen.

2302 $^{31}PO_4$- Gehalt der Algen.

Der Phosphatgehalt der Versuchsalgen wurde kolorimetrisch nach MARTLAND und ROBISON (1926; vgl. auch URBACH 1961) bestimmt. Hierzu wurden 50 ml der Algensuspension abgesaugt, nachgewaschen und, wie oben beschrieben, mit TCE abgetötet und extrahiert. Der Phosphatgehalt der einzelnen Fraktionen ergab sich wie folgt: Das Pu nach feuchter Veraschung des Filters mit den Algen, das GlP nach feuchter Veraschung

von einem Teil des TCE-Extraktes und das Pa direkt im TCE-Extrakt. Die Veraschung der Trockengewichtsproben ergab zudem noch den Gesamtphosphatgehalt.

2303 Chlorophyllgehalt.

Bei einem Teil der Versuche diente der Chlorophyllgehalt der Algen als Bezugsgröße. Er wurde ebenfalls kolorimetrisch bestimmt (n. ARNON 1949). Je 10 ml der Suspension wurden bei 6 550 g 10 min abzentrifugiert, in 1 ml Wasser aufgeschwemmt und im kochenden Wasserbad 70 sec erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden je 4 ml Azeton hinzugefügt, geschüttelt und die Röhrchen dann 24 h im Dunkeln bei 0° C aufbewahrt. Im Filtrat wurde dann das Chlorophyll bei 652 m/µ bestimmt.

2304 Zelldichte.

Die Zelldichte der Suspension wurde, wie angegeben, in einer Thoma-Zählkammer bestimmt.

24 Berechnung und Auswertung der Ergebnisse.

2401 Berechnung der Aktivitäten:

Die beim Messen der radioaktiven Lösungen erhaltenen Werte wurden um den Nulleffekt korrigiert und auf die Gesamtmenge der Lösung, auf das Trockengewicht, bzw. den Chlorophyllgehalt, der Algen und auf den Zeitpunkt des Versuchsbeginnes umgerechnet. Erst diese Werte wurden zur Auswertung, d. h. zur Bestimmung der Veränderungen und zur Ermittlung der Kurven herangezogen.

2402 Berechnungen bei den inaktiven Versuchen.

Die hierbei ermittelten Werte wurden ebenfalls auf Trockengewicht oder Chlorophyllgehalt der Algen be-

zogen. In dieser Form wurden die Werte ohne weitere Korrektur zur Auswertung verwendet.

2403 Parallelproben.

Bei den Versuchen wurden so weit wie möglich Parallelproben gemacht. Wo dies nicht möglich war, z. B. bei den Versuchen mit vormarkierten Algen, wurden die Werte sowohl durch ihre Lage in der Kurve, wie auch durch den Vergleich der Werte aus mehreren gleichartigen Versuchen gesichert.
Bei den Kurzzeit-Einlagerungsversuchen galten die Unterschiede nur als gesichert, wenn sie 10 % überstiegen. Umgekehrt durften die Abweichungen zwischen Parallelen nicht größer als 10 % sein. Bei den Versuchen mit vormarkierten Algen wurden die einzelnen Meßwerte immer auf die Gesamteinlagerung = 100 bezogen und dadurch die absoluten Meßwerte (Impulsraten) eliminiert. Dadurch wurden die Schwankungen zwischen parallelen bzw. vergleichbaren Proben wesentlich geringer, so daß u. U. Unterschiede von 2 % gesichert werden konnten. Bei den inaktiven (=Substrataufnahme-) Versuchen wurden nach Möglichkeit mit mehreren Parallelproben gearbeitet, um durch Ausscheiden der Extremwerte genauere Ergebnisse zu erhalten.

3 Ergebnisse

311 Wirkung der Glykolsäure auf die lichtabhängige Phosphorylierung.

Wie JACOBI (1959) zeigen konnte, erhöhen Gaben von Natriumglykolat die Einlagerung von $H_3{}^{32}PO_4$, die Markierung der TCE-löslichen organischen Phosphatverbindungen und die lichtabhängige Steigerung dieser Fraktion bei Ankistrodesmus braunii, wenn kurzzeitig radioaktives Phosphat geboten wird. Die Versuchsanordnung und - durchführung entsprachen dabei den in dieser Arbeit berichteten. JACOBI führte diesen Effekt auf die zugesetzte Glykolsäure, bzw. das zugesetzte Glykolat, zurück.

3111 Einfluß verschiedener Glykolsäurekonzentrationen.

An diesem Punkt setzten diese Untersuchungen ein. Zunächst sollte ermittelt werden, welches die für weitere Untersuchungen günstigste Glykolsäurekonzentration ist., wenn keine Natriumionen vorhanden sind. Hierbei zeigte sich bereits, daß die von JACOBI (1959) erzielten Ergebnisse nicht reproduziert werden konnten, wenn für die Versuche Glykolsäure statt Na-Glykolat verwendet wurde (vgl. Tabelle 1).

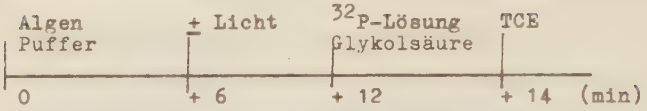
Versuch Nr. 26:

Ansatz: 10,0 ml Algensuspension,
1,5 ml Tris-puffer, 0,05 mol, pH 8,0,
1,5 ml Glykolsäurelösung
2,0 ml ^{32}P-Einlagerungslösung; 10^6 IpM, $10{,}8 \times 10^{-6}$ mol an inaktivem P.
15,0 ml

Temperatur: 25° C;
Belüftung: Luft + 3 % CO_2;

Beleuchtung: 2 x 10^4 Lux;

Versuchsablauf:



Das Ergebnis dieses Versuches zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: Einfluß verschiedener Glykolsäurekonzentrationen auf die Aufnahme radioaktiven Phosphates und auf den Einbau in das Po im Dunkeln und im Licht.

Glykolsäure Konzentration	Gesamt-^{32}P IpM	K=100	Org.-lösl. ^{32}P IpM	K=100	Li / Du Du=100
0 (H_2O):					
Dunkel	30.575	100,0	5.205	100,0	100,0
Licht	31.075	101,0	10.080	193,5	193,5
10^{-2}mol:					
Dunkel	18.795	61,2	2.225	42,7	100,0
Licht	22.035	71,7	6.215	119,0	315,5
10^{-3}mol:					
Dunkel	29.650	96,6	5.015	96,4	100,0
Licht	34.425	112,0	11.725	225,0	246,0
10^{-5}mol:					
Dunkel	29.800	97,0	5.620	108,0	100,0
Licht	33.350	108,5	11.485	220,5	205,5
10^{-7}mol:					
Dunkel	33.200	108,0	6.305	121,0	100,0
Licht	33.225	108,5	10.900	209,6	187,0

Die von JACOBI gefundene Erhöhung der ^{32}P-Einlagerung im Licht in Gegenwart von Glykolsäure konnte also in diesem Versuch, ebenso wie in vergleichbaren anderen, nicht gefunden werden. Sehr klar tritt hervor, daß die Glykolsäure im Dunkeln und im Licht keine, bzw. nur eine geringe Förderung (193,5 auf 225,0 %) hervorruft. Höhere Werte werden in keinem Fall erreicht. Statt der erwarteten Förderung tritt bei Konzentrationen über 10^{-3}mol Glykolsäure sogar eine deutliche Hemmung der ^{32}P-Einlagerung auf. Da diese Hemmung im Licht nicht so stark ist wie im Dunkeln, besonders bei der Einlagerung ins Po, kommt in diesem Versuch eine gewisse Steigerung des Licht-Dunkel-Verhältnisses zu stande.(315,0 gegenüber 193,5 %). Der Grund für diese Hemmung ist unbekannt, evtl. konkurriert das Glykolat-Ion mit dem $H_2PO_4^-$-Ion um die Adsorption an bestimmten Trägersubstanzen oder um die zur Aufnahme benötigte Energie (vgl. hierbei auch die Gesamt-P-Aufnahme!).
Aufgrund dieser Ergebnisse lag es nahe, die von JACOBI gefundene Förderung dem gleichzeitig zugesetzten Natrium zuzuschreiben, zumal SIMONIS und URBACH (1963) bereits eine Förderung der ^{32}P-Einlagerung in das Po, besonders im Licht, bei Zugaben von Natrium-Ionen gefunden hatten. Weitere Versuche sollten dies nun klären.

3112 Wirkung der Glykolsäure in Gegenwart von Alkali-Ionen.

Deshalb wurde nun untersucht, welchen Einfluß die mit NaOH auf pH 5,3 eingestellte Glykolsäure im Vergleich zu reiner Glykolsäure hat (bei 10^{-2}mol Glykolsäure war die hierfür benötigte Na-Konzentration 9×10^{-3}n). Das Ergebnis zeigt Versuch Nr. 28, der mit gleicher Versuchsanordnung wie Versuch 26, Abs.

Tabelle 2: Einfluß der Natrium-Ionen auf die lichtabhängige Steigerung des ^{32}P-Einbaues in das Gesamt-Phosphat und das Po.

Zugabe	Gesamt-^{32}P		Organisch-lösliches ^{32}P			
10^{-4}mol	IpM	K=100	IpM	K=100	% des Ges.-P	Li/Du Du=100
Wasser:						
Dunkel	96.850	100,0	20.550	100,0	21,1	100,0
Licht	100.300	104,0	36.350	177,0	36,0	177,0
Glykolsäure:						
Dunkel	103.350	108,0	19.200	93,5	18,4	100,0
Licht	98.050	106,5	38.600	186,5	37,4	199,5
NaOH:						
Dunkel	257.850	266,0	59.750	290,5	23,2	100,0
Licht	298.150	307,5	174,750	847,0	58,5	292,0
Na-Glykolat:						
Dunkel	268.900	278,0	62.900	306,0	27,7	100,0
Licht	300.800	310,0	186,000	906,0	61,9	298,0

3111, ausgeführt wurde. Die Resultate sind in Tabelle 2 dargestellt.

Dieser Versuch zeigt, daß die Glykolsäure keinen spezifischen Effekt auf die Einlagerung von kurzzeitig gebotenem radioaktivem Phosphat hat. Die leichte Erhöhung des Licht-Dunkel-Verhältnisses im Po (gegenüber den Kontrollen mit Wasser) liegt nur knapp über der Fehlergrenze und war nicht typisch, sie wurde auch nicht in allen Fällen wiedergefunden. Im Gegensatz hierzu steigert Natrium, mit oder ohne Glykolsäure, die Phosphataufnahme, die Einlagerung radioaktiven Phosphats, den prozentualen Anteil des Po an der Gesamteinlagerung und das Licht-Dunkel-Verhältnis im Po erheblich. Diese Steigerung liegt

weit über der Fehlergrenze und etwa in der von JACOBI (1959) gefundenen Größenordnung.
Diese Versuche zeigen, daß diese Steigerung gleichzeitig nur ein Effekt der zugegebenen Na-Ionen ist. Es mußte jedoch noch genauer geprüft werden, ob es sich hierbei nicht um einen Effekt der Alkali-Ionen im allgemeinen handelt. Dies war zwar unwahrscheinlich, da einmal die von SIMONIS und URBACH (1963) gefundene Erhöhung der ^{32}P-Einlagerung und der lichtabhängigen Phosphorylierung nur von Na^+, nicht aber von K^+ abhängt, und andrerseits in der verwendeten

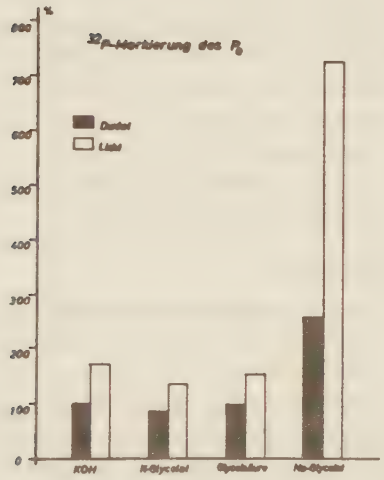


Abb. 3: Einwirkung der bezeichneten Zugaben auf die Einlagerung von markiertem Phosphat in das Po im Dunkeln und im Licht bei 2 min Einlagerungsdauer.

Nährlösung sehr viel Kalium enthalten war (vgl. Abs. 2111). Da aber MECHSNER (1959) und LATZKO und MECHSNER (1958) an Chlorella pyrenoidosa einen Einfluß von K^+ auf die Lichtphosphorylierung gefunden hatten, ferner LATZKO (1960) einen Einfluß von K-Ionen, nicht aber von Na-Ionen auf die oxydative Phosphorylierung entdeckt hatte, sollte dies noch überprüft werden.

In Versuch Nr. 36 wurden deshalb mit gleicher Versuchsanordnung und -durchführung wie in Versuch Nr. 28 untersucht, wie sich Gaben von KOH, K-Glykolat, Glykolsäure und Na-Glykolat auswirken. Das Ergebnis zeigt Abb. 3, S. 32.
Hiermit konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß nur Na^+-, nicht aber K^+-Ionen die starke Erhöhung der ^{32}P-Aufnahme bewirken. Eine Wirkung der Glykolsäure auf die lichtabhängige Phosphorylierung bei kurzzeitiger ^{32}P-Einlagerung ist damit ausgeschlossen, wenn die Glykolsäure gleichzeitig mit dem radioaktiven Phosphat zugesetzt wird.
Die Wirkung des Natriums kommt dabei vielleicht durch die Aktivierung einer ATPase zustande (JÄRNEFELT 1961; SKOU 1963; SQUIRES 1965).

3113 Vorgaben von Glykolsäure.

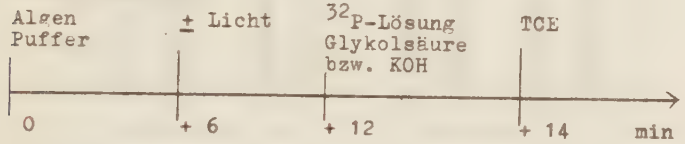
Die Möglichkeiten für eine Wirkung der Glykolsäure waren damit jedoch noch nicht erschöpft. Vorgaben konnten eventuell einen Effekt auf die kurzzeitige Einlagerung und die lichtabhängige Phosphorylierung haben, ähnlich wie dies bei der Glucose der Fall ist (SIMONIS und GRUBE 1953; SIMONIS und KATING 1956; MOSTAFA 1960; vgl. Abs. 321). Diese Möglichkeit sollte nun noch untersucht werden. Hierzu diente ein Versuch, bei dem K-Glykolat und KOH in gleicher Konzentration im Licht und im Dunkeln mit und ohne Vorgaben zugesetzt wurden. Als Dauer der Vorgabe wurden 15 min gewählt.

Versuch Nr. 37:

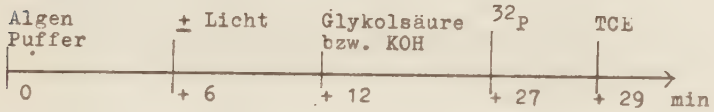
Ansatz: 10,0 ml Algensuspension,
1,5 ml Tris-puffer, 0,05 mol, pH 8,0,
1,5 ml Glykolsäure bzw. KOH
2,0 ml ^{32}P-Einlagerungslösung: 10^6 IpM,
$12{,}9 \times 10^{-6}$ mol an inaktivem P.
15,0 ml

Temperatur: 25° C,
Belüftung: Luft + 3 % CO_2,
Beleuchtung: 2×10^4 Lux,
Einlagerungsdauer: 2 min,

Versuchsablauf:



oder:



Das Ergebnis dieses Versuches zeigt Abb. 4, S. 35.

Durch diesen Versuch konnte nun auch die letzte Möglichkeit für eine Wirkung der Glykolsäure auf die ^{32}P-Einlagerung bei Ankistrodesmus braunii unter diesen Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden. Die im Versuch erhaltene Förderung durch Vorgaben tritt mit Glykolat und mit KOH auf, deshalb müssen die Versuchsbedingungen dafür verantwortlich gemacht werden. Da die Erhöhung der Gesamteinlagerung im Dunkeln wie im Licht auftritt, scheidet auch eine längere Vorbelichtung als Erklärung aus. Es bleiben

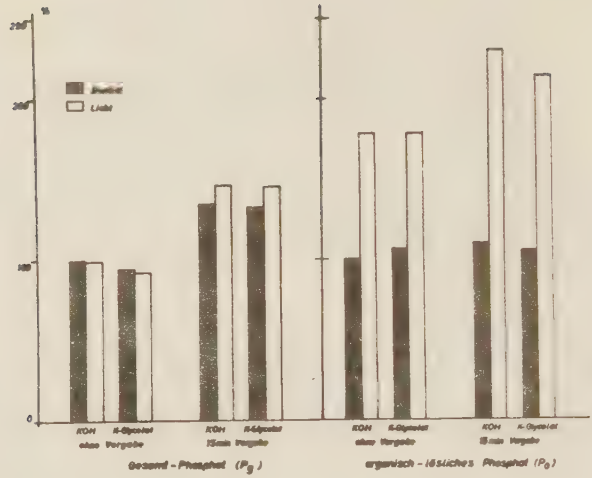


Abb. 4: Wirkung von Glykolsäure- und KOH-Vorgaben auf die ^{32}P-Einlagerung und auf die Markierung des Po. Die Werte sind auf die KOH-Kontrollen (Dunkel, ohne Vorgabe) = 100 bezogen. Einlagerungsdauer 2 min.

nur die Möglichkeiten einer längeren Eingewöhnung in den Küvetten, die längere Einwirkung des Puffers oder des höheren CO_2-Gehaltes der Luft. Dies sollte hier jedoch nicht geklärt werden.
Dieses negative Ergebnis überraschte zunächst sehr, denn in der Literatur wird häufig über einen Zusammenhang zwischen Glykolsäurestoffwechsel, Belichtung und Phosphathaushalt berichtet (Vgl. Abs. 41). Es ergab sich also die Notwendigkeit, im weiteren Verlauf der Untersuchungen die Aufnahme der Glykolsäure unter den Versuchsbedingungen zu prüfen.

312 Versuche zur Glykolsäure-aufnahme.

Die Methodik dieser Versuche ist bereits in Abs. 226 beschrieben. Die Ergebnisse soll der im folgenden beschriebene Versuch zeigen.

Versuch: Glykolsäureaufnahme bei pH 4,3

Ansatz: 51,0 ml Algensuspension
6,0 ml Phthalatpuffer 5 x 10^{-3}mol Endkonz.
3,0 ml Glykolsäure
60,0 ml

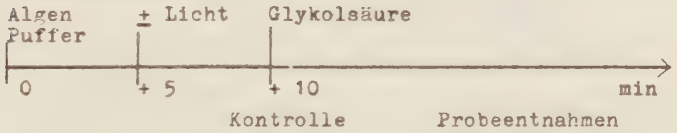
Temperatur: 25° C,

Belüftung: Luft ± CO_2,

Beleuchtung: 2 x 10^4 Lux,

Glykolsäure: 5 x 10^{-4}mol (= 38,025 µg / ml) Endkonz.

Versuchsablauf:



Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abb. 5, S. 37, dargestellt. Sie zeigen, daß unter den Versuchsbedingungen (phosphatverarmte Algen, pH 4,3, ± CO_2) Glykolsäure von Ankistrodesmus braunii nicht aufgenommen wird (es findet keine Nettoaufnahme statt. Ob eine Bruttoaufnahme bei gleichzeitiger Glykolsäureausscheidung stattfindet (TOLBERT und ZILL 1956), konnte allerdings nicht entschieden werden). Da damit auch eine Aufnahme bei pH 8,0 ausgeschlossen ist, (vgl. Abs. 4121), kommt eine Wirkung auf den Phosphatstoffwechsel nicht in Frage.
Auffällig ist, daß die gefundenen Extinktionswerte

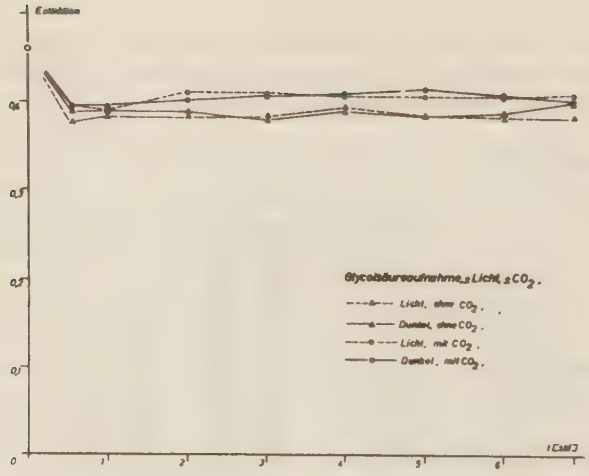


Abb. 5: Glykolsäureaufnahme durch Ankistrodesmus braunii im Dunkeln und im Licht bei pH 4,3, ± CO_2. Versuchsdauer 7 h.

immer niedriger sind als es, entsprechend der Eichkurve, der zugegebenen Glykolsäuremenge entspricht (0,460). Dies läßt sich zwanglos durch eine Adsorption, bzw. durch eine Aufnahme in den freilösenden Raum (AFS) erklären. Eine weitere Aufnahme findet aber nicht statt. Die Zeit von 7 h hätte selbst bei geringer Aufnahme erkennbare Unterschiede ergeben müssen. Noch längere Zeiten zu wählen, hätte auch wenig Sinn gehatt, eventuell wäre dann eine Licht- oder Substrataktivierung der Glykolsäuredehydrogenase möglich gewesen (KUCZMAK und TOLBERT 1962; TOLBERT und COHAN 1955).
Da damit auch die letzten Möglichkeiten für eine Wirkung der Glykolsäure ausgeschlossen waren, wurden die Untersuchungen mit Glucose fortgesetzt.

32 Wirkung der Glucose auf den Phosphateinbau.

Nachdem durch die weiter unten dargestellten Versuche über die Glucoseaufnahme feststand, daß Ankistrodesmus braunii Glucose sehr schnell aufnimmt und daß dabei auch die von KANDLER (1954 a) gefundene Erhöhung im Licht auftritt (vgl. Abs. 351), wurde in mehreren Vorversuchen geklärt, unter welchen Bedingungen Glucose einen maximalen Effekt auf die Phosphataufnahme und den Phosphateinbau bewirkt. Da die Versuchstemperatur der Anzuchttemperatur entsprechen sollte, wurden zuerst der Einfluß verschiedener Glucose- und H^+-Ionen-Konzentrationen geprüft. Diese Versuche wurden, wie auch alle folgenden, mit Synchronalgen (vgl. Abs. 212) durchgeführt.

321 Einwirkung verschiedener Glucosekonzentrationen.

3211 Kurzzeiteinlagerung mit niedrigen Phosphatkonzentrationen.

Zunächst wurde geprüft, wie Glucosegaben verschiedener Konzentration auf den Phosphateinbau bei niedrigen Phosphatkonzentrationen in Kurzzeitversuchen wirken. Das Ergebnis zeigt der folgenden berichtete Versuch Nr. H 13.

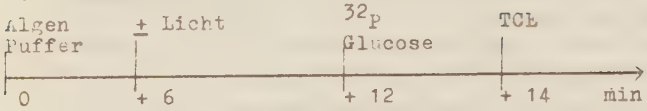
Versuch Nr. H 13:

Ansatz: 10,0 ml Algensuspension,
1,5 ml Phthalatpuffer pH 5,6 (vgl. Abs. 322),
1,5 ml Glucoselösung,
2,0 ml ^{32}P-Einlagerungslösung: 10^6 IpM, $21{,}5 \times 10^{-6}$ mol an inaktivem P.

15,0 ml

Temperatur: 30° C,
Belüftung: Luft ohne CO_2,
Beleuchtung: 2 x 10^4 Lux,
Einlagerungsdauer: 2 min,

Versuchsablauf:



Die Ergebnisse dieses Versuches zeigt Tabelle 3, S. 40. Es fallen dabei folgende Tatsachen auf:

a) Im Dunkeln wie im Licht tritt im Po - wie weitere Versuche zeigten vor allem in den Zuckerphosphaten - eine starke Erhöhung auf, wobei aber bei der gewählten Einlagerungsdauer von 2 min Gaben über 100 µg Glucose/ml keinen Effekt mehr zeigen. Der glucoseabhängige Phosphateinbau ist also bei diesen Konzentrationen gesättigt.

b) Die Steigerung der Markierung des Po ist im Dunkeln prozentual größer als im Licht, obwohl auch hier der absolute Wert des Po im Licht weit über den Dunkelwerten liegt. Das Licht-Dunkel-Verhältnis sinkt aber von 232 % (Dunkel = 100 %) ohne Glucose auf 159 % beim 1000 µg Glucose / ml (164 % bei 100 µg Glucose / ml) ab. Diese Erscheinung, daß sich Glucosegaben im Dunkeln relativ stärker auf den Phosphatstoffwechsel auswirken als im Licht, wurde auch unter anderen Versuchsbedingungen immer wieder gefunden.

c) Trotz des starken Anstieges im Po bei Glucosegaben von 100 µg / ml und mehr bleibt die Gesamteinlagerung praktisch konstant. Bei einigen Versuchen zeigte sie sogar eine geringe Tendenz, mit steigender Glucosekonzentra-

Tabelle 3: Wirkung steigender Glucosekonzentrationen auf die Einlagerung und den Einbau von markiertem Phosphat im Dunkeln und im Licht.

Glucose-zugabe	Gesamt-^{32}P IpM	Gesamt-^{32}P ± Glucose = 100	Organisch-lösliches ^{32}P IpM	Organisch-lösliches ^{32}P ± Glucose = 100	Anteil (%) am Ges.-P
0 (Kontrolle):					
Dunkel	171.850	100,0	32.550	100,0	19,0
Licht	235.650	100,0	75.400	100,0	31,9
10 µg/ml:					
Dunkel	162.050	94,4	54.200	166,5	33,0
Licht	242.725	103,0	80.500	107,0	33,3
100 µg/ml:					
Dunkel	157.800	91,3	58.200	178,5	37,0
Licht	230.150	97,5	96.250	128,0	41,8
1000 µg/ml:					
Dunkel	154.625	90,0	60.200	185.0	38,2
Licht	239.300	101,5	95.650	127.0	40,1

tion abzusinken (im dargestellten Versuch zeigt sich dies bei der Einlagerung im Dunkeln.

d) das anorganische Orthophosphat (Pa) und das säureunlösliche Phosphat (Pu) - beide in der Tabelle nicht aufgeführt - sind gegenüber den Kontrollen wesentlich schwächer markiert. Dies beruht jedoch nur auf der kurzen Dauer der Glucoseaufnahme. Wird die Glucose längere Zeit vor dem ^{32}P zugesetzt, so wird auch die Einlagerung in diese beiden Fraktionen gesteigert, wie Versuch H 14, Abs. 323, zeigt.

Dieser Versuch zeigte also, daß es zweckmäßig war, im Sättigungsbereich, d. h. mit Konzentrationen von

mehr als 100 /ug Glucose / ml zu arbeiten, vor allem in Versuchen, bei denen über einen längeren Zeitraum hinweg Glucose aufgenommen werden sollte. Diese Versuche wurden deshalb meist mit Konzentrationen von 500 oder 1000 /ug Glucose / ml ausgeführt.

3212 Langzeitversuche mit höheren Phosphatkonzentrationen.

Im Anschluß daran sollte nun die Phosphataufnahme ± 1000 /ug Glucose / ml im Dunkeln und im Licht bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen im Medium untersucht werden. Hierbei wurden die verwendeten ^{31}P-lösungen so mit ^{32}P markiert, daß sich aus der Markierung der Algen die ^{31}P-Aufnahme berechnen ließ. Die Algen wurden nicht fraktioniert, sondern nur die Gesamtaufnahme bestimmt.

Versuch Nr. GA 18:

Ansatz: 2,5 ml Algensuspension,
0,4 ml Glucoselösung,
0,5 ml Phthalatpuffer pH 5,6,
0,6 ml Phosphatlösung (+ 152.000 IpM)
4,0 ml

Temperatur: 30° C,
Belüftung: Luft ohne CO_2,
Belichtung: 2 x 10^4 Lux,
Einlagerungsdauer: 60 min,
Einlagerungsküvette: Warburg-Gefäße (vgl. Abs. 2222),

Das Ergebnis dieses Versuches zeigt Abb. 6, S. 42, in doppelt logarithmischer Darstellung. Es ergab sich für alle geprüften Fälle (± 1000 /ug Glucose/ml, ± Licht) die gleiche Kurve. Dies beweist, daß bei höheren Phosphatkonzentrationen die Aufnahme nur von

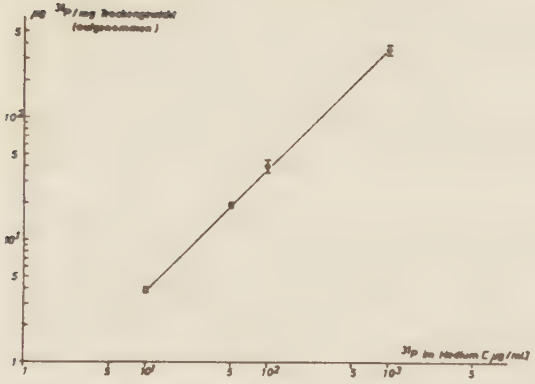


Abb. 6: Phosphataufnahme durch Ankistrodesmus braunii in Abhängigkeit von der Konzentration im Außenmedium. Bei den einzelnen Punkten der Kurve ist die Streuung eingetragen, die sich zwischen den verschiedenen Ansätzen (± Licht, ± Glucose) ergab.

der Konzentration im Medium abhängt. Eine Wirkung der Glucose läßt sich also nur bei niedrigen Phosphatkonzentrationen finden, d. h. bei geringer Phosphataufnahme durch die Algen.

322 pH-Abhängigkeit der Glucosewirkung.

Als nächstes sollte die pH-Abhängigkeit der Glucosewirkung auf die Phosphataufnahme, speziell auf den Einbau in das Po, untersucht werden. Dabei wurden drei pH-Bereiche geprüft, bzw. verglichen, in denen schon frühere Untersuchungen durchgeführt worden waren:

a) pH 8,0 mit Tris-Puffer (Tris-HCl), bei dem die meisten Untersuchungen über die Phosphateinlagerung an Ankistrodesmus braunii ge-

macht worden waren (vgl. URBACH 1961).

b) pH 5,6 mit K-Phthalatpuffer. KANDLER (1954 a) hatte in diesem Bereich mit Phosphatpuffer gearbeitet. Da dies nicht mögliche war (P-Verarmung), wurde Phthalatpuffer beim gleichen pH-Wert verwendet (vgl. auch SAMEJIMA und MYERS 1958).

c) pH 4,3 mit K-Phthalatpuffer. Bei diesem pH-Wert hatten SIMONIS (1956) und SIMONIS und KATING (1956) an Ankistrodesmus braunii, ROTHSTEIN (1956) an Hefen und ZÖLLNER (1952) an Chlorella die Einflüsse der Glucose bzw. die Glucoseaufnahme untersucht.

Die Versuche wurden alle mit der oben beschriebenen

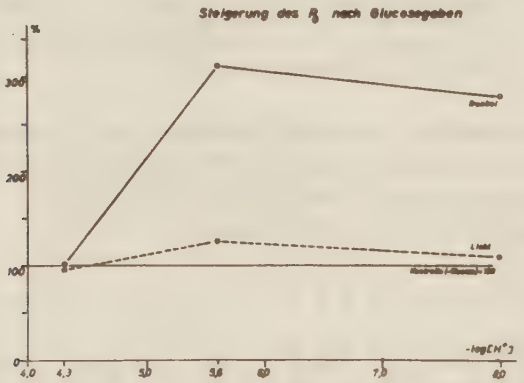


Abb. 7: Einfluß des pH-Wertes auf die Einlagerung von ^{32}P in das Po im Dunkeln und im Licht in Gegenwart von Glucose. Die Kontrollen ohne Glucose sind jeweils = 100 gesetzt.

Anordnung durchgeführt. Die Glucosekonzentration betrug immer 1000 /ug / ml. Die Ergebnisse aus mehreren Versuchen sind zusammengefaßt in Abb. 7, S. 43, dargestellt, wobei immer die durch die Glucose verursachten Unterschiede gegenüber den Kontrollen mit Wasser bei gleichem pH-Wert aufgetragen sind. Es zeigt sich, daß zwischen pH 5,6 und pH 8,0 keine wesentlichen Veränderungen mehr auftreten, obwohl die Unterschiede noch deutlich sichtbar sind. Bei pH 4,3 ist dagegen kaum ein Einfluß der Glucose vorhanden, auch die Gesamteinlagerung war in diesem pH-Bereich sehr niedrig. Da offensichtlich die Glucose bei pH 5,6 die größte Wirkung hat (vgl. auch KANDLER 1954), wurden die folgenden Untersuchungen bei diesem pH-Wert ausgeführt.
Bei der gewählten Darstellungsweise tritt auch besonders hervor, daß die Steigerung durch Glucosegaben im Dunkeln wesentlich größer als im Licht i

323 Vorgaben von Glucose.

In den oben beschriebenen Versuchen erhielten die Algen immer die Glucose gleichzeitig mit der Aktivität. In weiteren Vorversuchen sollte noch die Wirkung steigender Vorfütterungszeiten untersucht werden.

Versuch H 14:

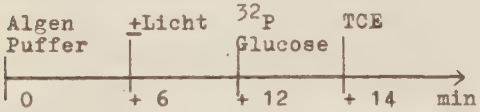
Ansatz: 10,0 ml Algensuspension,
2,5 ml Phthalatpuffer pH 5,6,
1,5 ml Glucoselösung (1000 /ug / ml Endkonz.)
2,0 ml ^{32}P-Einlagerungslösung.
15,0 ml

Temperatur: 30° C,
Belüftung: Luft ohne CO_2,
Beleuchtung: 2 x 10^4 Lux,

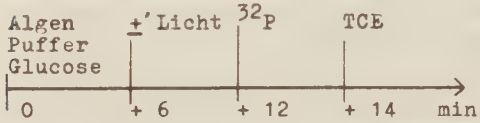
Einlagerungsdauer: 2 min,

Versuchsablauf:

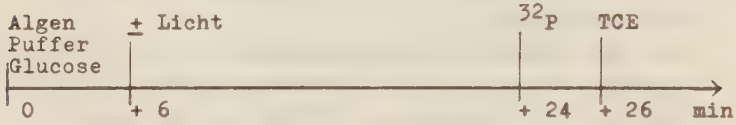
a) ohne Vorgabe



b) mit 12 min Vorgabe



c) mit 24 min Vorgabe



Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 9, S. 46, dargestellt (ohne die Kurven für das Pa und das Pu). Es zeigt sich, daß mit steigenden Vorfütterungszeiten auch die Einlagerung gleichmäßig ansteigt. Dies gilt sowohl für die Gesamteinlagerung, wie auch für die einzelnen Fraktionen, die sich ähnlich verhalten, wie das in Abb. 9 dargestellte Po. Da die durch die Vorfütterung bedingte Erhöhung der Fraktionen im Dunkeln und im Licht etwa parallel verläuft, muß es eine lichtunabhängige Reaktion sein. Die Steigerung der Einlagerung in das Pu ist für die Deutung der Glucoseaufnahme wichtig, da sie auf einen sehr schnellen Stoffwechsel der (oder einiger) Verbindungen des Pu hinweist. In Abs. 36 und Abs. 4252 wird darauf weiter eingegangen.

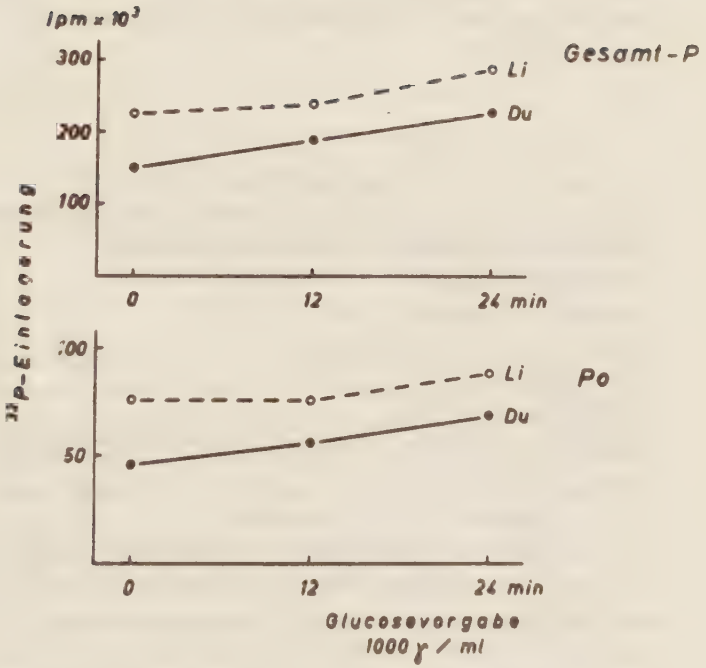


Abb. 9: Wirkung steigender Vorfütterungszeiten auf den glucoseabhängigen Phosphateinbau in das Gesamt-P und in das Po im Dunkeln und im Licht. ^{32}P-Einlagerungsdauer 2 min.

33 Glucosewirkung auf vormarkierte Algen.

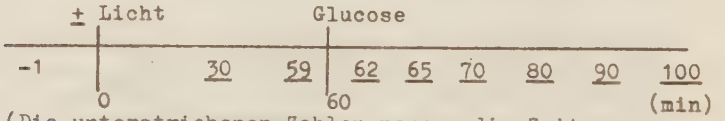
Nach diesen Versuchen sollte nun untersucht werden, welche Phosphatspiegelschwankungen Glucosegaben bei Ankistrodesmus braunii hervorrufen. Hierzu wurden die Algen wie beschrieben (Abs. 2214) mit ^{32}P vormarkiert und ihnen dann im Versuch Glucose geboten. Die Veränderungen der drei Fraktionen wurden in den danach entnommenen Proben bestimmt, wobei die vor der Glucosezugabe entnommenen Proben als Kontrollwerte dienten.

331 Glucosezugabe zu vormarkierten Algen.

Versuch Nr. H 37 zeigt ein Experiment, bei dem die vormarkierten Algen vor und während der Glucoseaufnahme mit CO_2-freier Luft begast wurden.

Versuch Nr. H 37:
Algen: vormarkiert, vgl. Abs. 2214,
Belüftung: Luft ohne CO_2,
Beleuchtung: 2 x 10^4 Lux,
Temperatur: 30° C,
Substrat: Glucose, 1000 µg / ml Endkonzentration,

Versuchsablauf:



(Die unterstrichenen Zahlen nennen die Zeiten, an denen die Proben entnommen wurden; vgl. Abb. 10, S.48)

Der Versuch zeigt - in Abb. 10, S. 48, dargestellt - daß die Algen weitgehend gleichmarkiert waren, so daß die vor der Glucosezugabe entnommen Kontrollproben nur noch geringfügig streuten - eine völlige Gleichmarkierung ist sicher bei der relativ kurzen

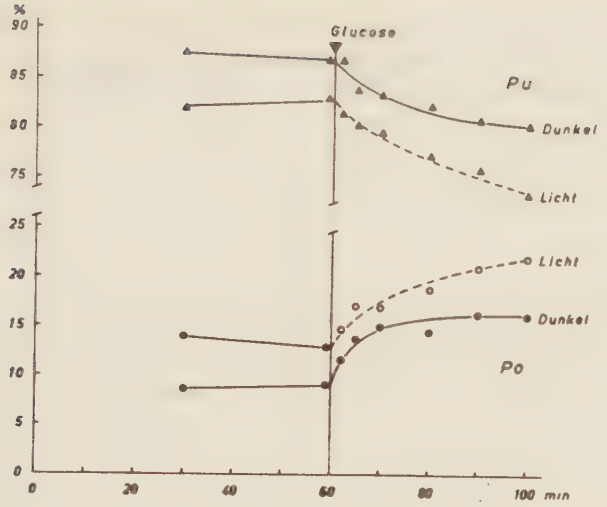


Abb. 10: Änderung der Fraktionen vormarkierter Algen nach Glucosegaben im Dunkeln und im Licht. Die durchperlende Luft enthielt kein CO_2.

Voreinlagerung noch nicht zu erwarten, sie war für diese Versuche auch nicht unbedingt erforderlich - . Nach der Zugabe der Glucose traten jedoch sofort starke Veränderungen auf. Wie bei den oben beschriebenen Versuchen wird das Po sehr schnell erhöht, so daß es im Licht bis auf 20 % des in den Zellen enthaltenen Phosphates ansteigen kann. Das Pa (in Abb. 10 nicht dargestellt) sinkt vorübergehend etwas ab. Für die Werte im Dunkeln zeigen die Kurven ein ähnliches Bild wie im Licht, lediglich das Po ist immer etwas niedriger als im Licht, das Pu ist dementsprechend etwas höher. Wie die Kurven zeigen, stammt die Hauptmenge des ^{32}P, das neu in das Po eingebaut wird, aus dem Pu, d. h. entweder aus den Phosphatreserven (Polyphosphate) oder aus dem Stoff-

wechsel der TCE-unlöslichen Verbindungen auf dem Umweg über das Pa. Eine Entscheidung zwischen diesen Möglichkeiten konnte hier noch nicht getroffen werden.

332 Wirkung der Glucose auf vormarkierte Algen bei Anwesenheit von CO_2.

Bisher war bei den Versuchen mit Glucose immer ohne CO_2 gearbeitet worden, da aufgrund der Arbeiten von KANDLER (1955) Kohlendioxyd und Glucose um die Aufnahme in die Zellen, d. h. um die Assimilation, konkurrieren. An dieser Stelle sollte aber einmal die gleichzeitige Einwirkung von CO_2 und Glucose untersucht werden. Das Ergebnis dieser Versuche zeigt Versuch Nr. H 29, der in Abb. 11, S. 50, dargestellt ist.

Die Versuchsbedingungen waren dabei genau die gleichen wie bei Versuch Nr. H 37, nur enthielt die durchgeleitete Luft 1,5 % CO_2. Aus praktischen Gründen wurden auch die Proben nach der Substratzugabe zu etwas anderen Zeitpunkten abgenommen (1, 3, 5, min nach der Zugabe).

Während die Kurven der verdunkelten Algen gegenüber dem obigen Versuch keine Veränderungen aufweisen - was zu erwarten war, denn eine Konkurrenz zwischen CO_2- und Glucose-Fixierung kann nur im Licht auftreten - , verlaufen die Kurven im Licht anders. Mit dem Einschalten der Beleuchtung steigt das Po gleichmäßig an, das Pu fällt ebenso gleichmäßig ab. Es wird also auch hier für die CO_2-Assimilation Phosphat aus den Reserven oder aus dem Stoffwechsel herangezogen. Die Zugabe der Glucose hat zwar noch einen deutlichen Effekt, aber die Veränderung des Kurvenverlaufes ist gering und klingt schnell wieder ab.

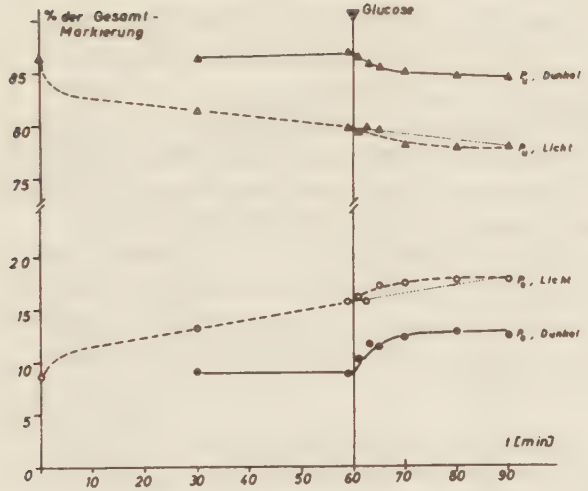


Abb. 11: Änderung der Fraktionen des Po und Pu vormarkierter Algen nach Glucosegaben im Dunkeln und im Licht. Der durchperlenden Luft waren 1,5 % CO_2 beigemischt.

Nach 20 - 30 min verläuft die Kurve wieder genau in der Fortsetzung des Verlaufes vor der Glucosezugabe. Der CO_2-Gehalt der Gasphase verändert also die Kurve bereits in der gleichen Richtung wie die Glucose, so daß die Substratassimilation schwächer und später nicht mehr in Erscheinung tritt. Die von KANDLER gefundene Konkurrenz der beiden C-Quellen tritt also auch unter unseren Versuchsbedingungen auf.
Dieses Ergebnis ließ es also geraten erscheinen, bei weiteren Untersuchungen, wie bisher, unter Ausschluß von CO_2 zu arbeiten.

34 Versuche mit Desoxyglucose

2-Desoxy-glucose ist eine der glucose-analogen Verbindungen, die in den letzten Jahren häufig zur Untersuchung der Glucose-Aufnahme und des -Stoffwechsels herangezogen wurden (COHEN und MONOD 1957; CRAMER und WOODWARD 1952; LETNANSKY 1964). Dabei zeigte sich, daß 2-Desoxy-glucose im allgemeinen als 2-Desoxy-glucose-6-Phosphat liegen bleibt (BARBAN und SCHULTZE 1962; OVERGAARD-HANSEN 1965; LETNANSKY 1964). Damit war es möglich, zwischen der Phosphorylierung und der Weiterverarbeitung der aufgenommenen Glucose einen Block zu legen und die davor liegenden Vorgänge genauer zu untersuchen.

341 Einfluß der 2-Desoxyglucose auf die ^{32}P-Aufnahme.

Zunächst wurde, wie oben, geprüft, ob sich bei gleichzeitiger Zugabe von Substrat, also von 2-Desoxyglucose, und von radioaktivem Phosphat eine Wirkung feststellen läßt. Dazu wurden in Versuch H 33 die Wirkungen von Glucose und 2-Desoxy-glucose auf die ^{32}P-Einlagerung verglichen. Die Versuchsanordnung und -ausführung entsprachen dabei genau Versuch H 13, S. 38, das Ergebnis ist in Tabelle 4, S. 52, dargestellt. Unter den Versuchsbedingungen zeigt die 2-Desoxy-glucose keinen erkennbaren Effekt auf die Einlagerung und den Einbau des markierten Phosphats. Dies ist sehr überraschend, da nach den deutlichen Wirkungen von Glucosegaben auch eine Wirkung der 2-Desoxy-glucose zu erwarten wäre. Für das negative Ergebnis sind folgende Erklärungen denkbar:

a) Die 2-Desoxy-glucose wird nicht aufgenommen.
b) Die 2-Desoxy-glucose wird zwar aufgenommen, aber sie wird nicht phosphoryliert und bleibt als freie Hexose liegen (BURGER und Mitarb. 1959).

Tabelle 4: Vergleich der Wirkungen von Glucose und 2-Desoxy-glucose gegenüber einer Wasserkontrolle auf die Aufnahme und den Einbau von ^{32}P.

Substrat	Einlagerung in die Fraktionen (IpM x 10^3) Gesamt-P	Po	Pa	Pu
Wasser (Kontrolle)				
Dunkel	101.850	43.675	35.475	22.700
Licht	136.450	78.700	33.350	24.400
Glucose 100 µg / ml				
Dunkel	103.750	68.600	14.300	20.850
Licht	143.700	91.700	30.450	21.550
2-Desoxy-glucose 91,2 µg / ml				
Dunkel	105.300	45.900	34.600	24.800
Licht	137.650	81.700.	30.575	25.825
Glucose 1000 µg / ml				
Dunkel	107.950	71.500	16.100	20.350
Licht	133.150	93.200	20.950	19.000
2-Desoxy-glucose 912 µg / ml				
Dunkel	107.250	44.600	33.050	24.600
Licht	133.425	77.950	29.050	26.425

c) Die 2-Desoxy-glucose wird aus P-Quellen phosphoryliert, die nicht in den steady-state-P-Stoffwechsel der Zellen einbezogen sind und die damit auch kein ^{32}P auf die 2-Desoxy-glucose übertragen können, wenn beide nur gleichzeitig und 2 min lang gegeben werden.

d) 2-Desoxy-glucose wird, wie auch die Glucose, bei der Aufnahme phosphoryliert, aber so, daß keine steigerung der Markierung des Po eintritt. Diese Erhöhung beruht dann ausschließlich auf Phos-

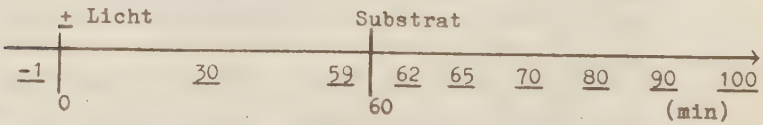
phorylierungsreaktionen, die im weiteren Umsatz des Glucose-6-P auftreten, etwa auf der Bildung von Hexose-di-P, von UDPG oder ADPG, oder auf der Triosephosphat-dehydrogenase-reaktion.

342 Wirkung von 2-Desoxyglucose auf vormarkierte Algen.

Um zu entscheiden, welche der obigen Erklärungsmöglichkeiten zutrifft, wurde nun untersucht, wie die 2-Desoxy-glucose auf vormarkierte, also mehr oder weniger gleichmarkierte Algen, wirkt. In diesen Algen sind auch die Verbindungen markiert, die nach kurzfristiger (2 oder 5 min) Einlagerung noch kein ^{32}P enthalten, etwa die Poly-Phosphate. Wenn ein Einfluß der 2-Desoxy-glucose vorhanden ist, muß er sich bei diesen Versuchen zeigen, deren Ergebnisse in Abb.12, S. 54 dargestellt sind. Als Beispiel diene Versuch H 36.

Versuch H 36:

Algen: vormarkiert,
Belüftung: Luft ohne CO_2,
Beleuchtung: $\pm$ 2 x 10^4 Lux,
Temperatur: 30° C,
Substrat: 2-Desoxy-glucose, 0,912 mg/ml Endkonz.,
Versuchsablauf:



(Die unterstrichenen Zahlen nennen die Zeitpunkte der Probeentnahmen)

Das Ergebnis ist in Abb. 12, S. 54, dargestellt.

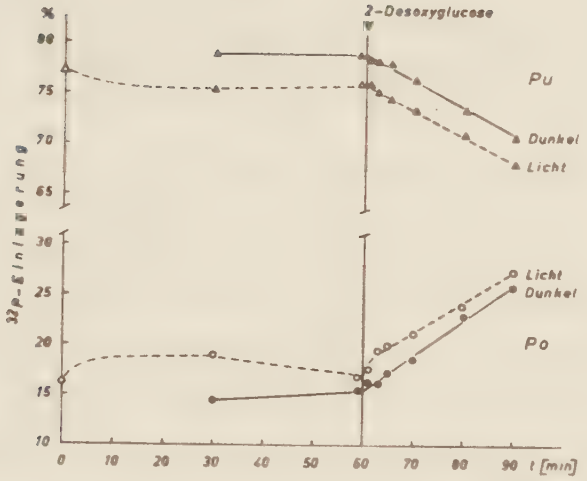


Abb. 12: Änderung der Fraktionen des Po und Pu vormarkierter Algen nach Zugabe von 2-Desoxyglucose im Dunkeln und im Licht. Die Gasphase enthielt kein CO_2.

Dieser Versuch läßt erkennen, daß die 2-Desoxyglucose den Phosphatstoffwechsel der vormarkierten Algen deutlich beeinflußt. Sie muß also aufgenommen und phosphoryliert werden, wie dies aufgrund der Literatur auch zu erwarten ist (SCHARFF 1961; BARBAN und SCHULTZE 1962; AUGUSTIN und Mitarb. 1964; u. a.). Die Erklärungsmöglichkeiten a) und b), Abs. 341, S. 51, treffen damit also nicht zu.
Es bleiben somit noch zwei Möglichkeiten offen und es stellt sich die Frage, welche von beiden zutrifft. Dafür ist zunächst zu klären, welche P-Verbindungen aus der TCE-unlöslichen Fraktion als Phosphatdonatoren in Frage kommen oder ob nicht einfach das im Stoffwechsel des Pu freiwerdende Phosphat in den

Zuckerphosphaten festgelegt wird. Bei den Versuchen mit vormarkierten Algen wurden die Werte immer auf die Gesamtmarkierung (=100 %) bezogen, so daß eine Erhöhung des Po zwangsläufig zu einer Verringerung der anderen Fraktionen führt. Deswegen sollte nun eine genauere Auftrennung der Verbindungen des Pu erfolgen.

343 Einfluß von Glucose und 2-Desoxy-glucose auf vormarkierte Algen; Auftrennung der Fraktionen.

Im folgenden sind bei gleicher Versuchsanordnung wie oben (Abs. 331, S. 47, und Abs. 342, S. 53) mehrere Versuche mit Glucose und 2-Desoxy-glucose durchgeführt worden. Dabei wurden die Fraktionen des Po und des Pu noch weiter zerlegt (Vgl. Abs. 2254, S. 20, und Abs. 2255, S. 21). Bei diesen Versuchen ließen sich wegen der längeren Extraktionsdauer und der dabei auftretenden Zerstörung von Makromolekülen (RNS!) bestimmte Streuungen nicht vermeiden. Deshalb wurden für die Kurven die Mittelwerte aus mehreren Versuchen gebildet. Dies war leicht möglich, da die Stärke der Markierung in den einzelnen Fraktionen und Verbindungen von Versuch zu Versuch nur geringfügig schwankte. Die hierbei erhaltenen Werte aus den Versuchen Nr. H 39 bis H 45 sind in Abb. 13, S. 57, für die wichtigsten Fraktionen als Kurven dargestellt. (Dabei stehen immer die entsprechenden Kurven der Glucose- und der 2-Desoxy-glucose-Versuche gegenüber).

3431 Die Verbindungen des TCE-Extraktes.

a) anorganisches Orthophosphat:
Die Kurven zeigen sofort nach Substratzugabe

einen geringen Abfall, dann stellt sich ein neues Niveau ein. Auffallend ist die geringere Abnahme nach Gaben von 2-Desoxyglucose.

b) Barium-Niederschlag (Poly-Phosphat "A"):
Diese Fraktion war im Gegensatz zu Versuchen mit kurzfristiger ^{32}P-Einlagerung (ULLRICH, pers. Mitteilg.) stets nur sehr schwach markiert.

c) Säurelabiles Po (labiles Nucleotid- und Zucker-Phosphat):
Diese Verbindungen weisen nur im Licht + Glucose Veränderungen auf, die eventuell mit stärkerem Wachstum gedeutet werden können (dies gilt auch für die geringe Zunahme des ba-gefällten ^{32}P nach Glucosegaben).

d) stabiles Po (stabiles Zucker- und Nucleotid-Phosphat):
Diese Verbindungen zeigen sofort nach Substratgaben einen charakteristischen Anstieg. Im Dunkeln ist er zwar relativ größer, absolut bleibt aber die Fraktion im Licht immer stärker markiert. Hier besteht auch ein deutlicher Unterschied im Kurvenverlauf nach Glucose- bzw. 2-Desoxy-glucose-gaben. Das stabile Zucker-P steigt nach der Glucosezugabe an und nähert sich dann einem neuen, höheren Niveau, das es aber nie ganz erreicht, evtl. wegen des gleichzeitigen Wachstums. Nach Gaben von 2-Desoxyglucose steigen dagegen die Kurven im Dunkeln und im Licht gleichmäßig an, 60 min nach der Substratzugabe ist noch keine Veränderung des Kurvenverlaufes zu sehen. Gleichzeitig sieht man - sieht man von dem unterschiedlichen Ausgangspunkt ab - , daß die Kurve im Licht nicht steiler als im Dunkeln ansteigt, sogar etwas flacher. Daraus kann man folgendes schließen:

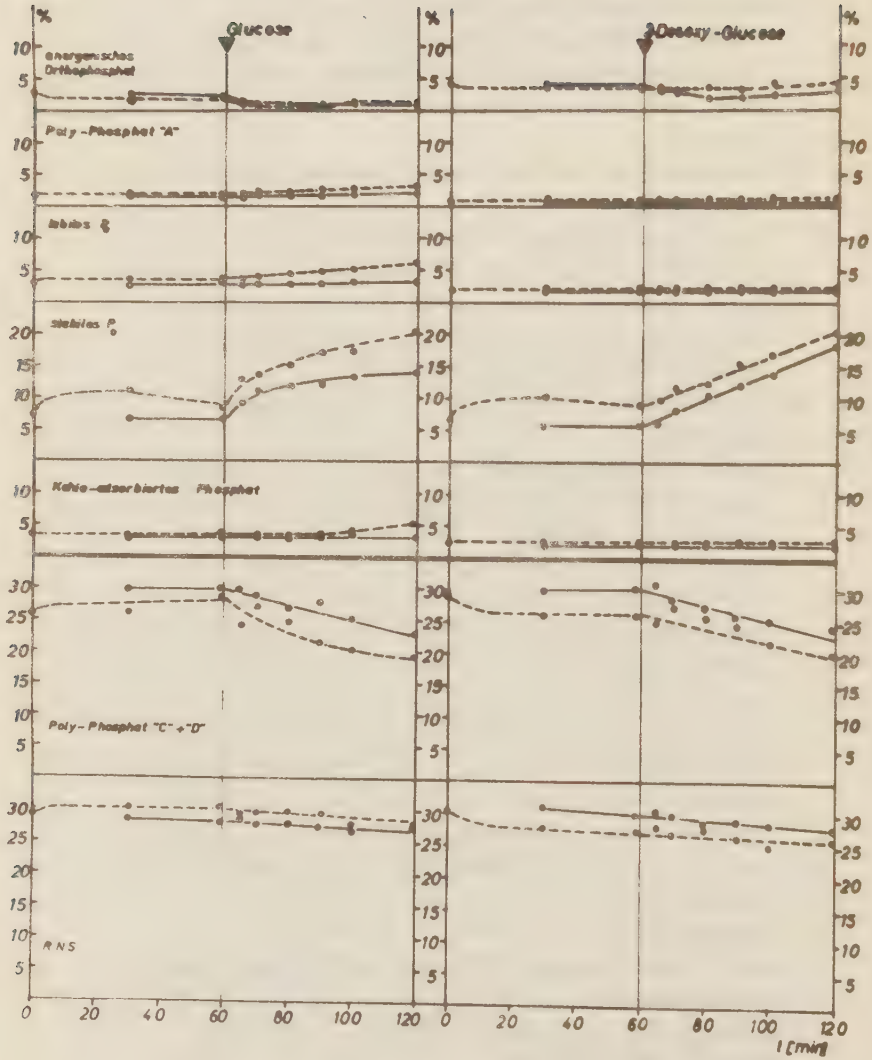


Abb. 13: Die wichtigsten aus dem P_o und P_u isolierten Fraktionen. Erklärungen im Text.

Glucose wird phosphoryliert und dann weiterverarbeitet, wobei, wie die Sättigungskurve zeigt, auch Dephosphorylierungen auftreten. Dabei wird, wie aus den großen Licht-Dunkel-Unterschieden zu entnehmen ist, ein lichtabhängiger Schritt durchlaufen. Die 2-Desoxy-glucose wird dagegen nur aufgenommen und phosphoryliert - wobei kein lichtabhängiger Vorgang durchlaufen wird - und das entstandene 2-Desoxy-glucose-6-Phosphat bleibt in der Zelle liegen [1]).

Eigenartig ist auch der Verlauf der Kurven im Licht vor der Substratzugabe. Nach 30 min ist der Wert des Po (stabiles Po) stets größer als nach 60 min (nach Einschalten der Beleuchtung). Die Erklärung könnte darin liegen, daß einige Verbindungen noch nicht restlos gleichmarkiert sind.

d) Kohleadsorbiertes (=Nucleotid-) Phosphat:
Diese Fraktion zeigt sehr viel Ähnlichkeit mit dem labilen Po. Es tritt nur im Licht nach Glucosegaben ein Anstieg auf, der auch wieder auf Wachstumsvorgänge zurückgeführt werden kann.

3432 Äthanol-Äther-lösliches P, Lipoid-Phosphat:

(Diese Fraktion ist in Abb. 13 nicht dargestellt)
Diese Fraktion zeigte keine Änderungen, was zu erwarten war. Eine Zu- oder Abnahme - etwa infolge des Wachstums nach Glucosegaben - findet nicht statt.

---

[1]) Inzwischen hat Herr GIMMLER die gebildete 6-Phospho-2-Desoxy-glucose auch chromatographisch nachweisen können.

3433 Glycinpuffer (pH 9,0)-lösliches P:

(Diese Fraktion ist in Abb. 13 nicht dargestellt)
Die Fraktionen, die aus dem Glycinpuffer-Extrakt isoliert wurden, zeigten nur eine sehr geringe Abnahme nach der Substratzugabe. Diese Abnahme fiel aber, zumal der Extrakt immer nur schwach markiert war, nicht ins Gewicht.

3434 NaOH-lösliches P:

Dieser Extrakt enthielt immer die stärkste Markierung. Oft fanden sich über 50 % des ^{32}P der Zellen in dieser Fraktion.

a) Anorganisches Ortho-Phosphat:
(Diese Fraktion ist in Abb. 13 nicht dargestellt)
Dieses Phosphat entsteht bei der alkalischen Hydrolyse der durch 1 n NaOH gelösten Verbindungen. Da es sich somit nur um einen Artefact handelt, dem keine Fraktion des Phosphats in den Zellen zugeordnet werden kann, traten hier auch die weitaus stärksten Schwankungen in den Meßwerten auf. Dementsprechend konnte auch keine gesicherte Zu- oder Abnahme gefunden werden. Es ist allerdings auffällig, daß die aus belichteten Algen gewonnenen Werte meist etwas stärker als die aus den Dunkel-Algen erhaltenen streuten.

b) Bariumniederschlag (Poly-Phosphat "C" und "D"):
(Zur Nomenklatur der Polyphosphate vgl. MIYACHI 1963; KANAI und Mitarb. 1965).
Diese Fraktion war auch nach der P-Verarmung der Algen noch stark markiert. Sie enthielt bis zu 35 % des ^{32}P der Zellen. Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit KANAI und SIMONIS (im Druck). Hier zeigte sich auch eine starke und gesicherte Abnahme, wenn auch die

Kurven infolge der Streuung den Anstieg im stabilen Zucker-P nicht genau widerspiegeln. Es wird aber deutlich, daß die Phosphorylierung der Zucker bei der Aufnahme wohl mit Hilfe des in den Polyphosphaten "C" und "D" ("C" oder "D") enthaltenen Phosphates erfolgt.

c) Kohle-adsorbiertes P (RNS):
Diese Fraktion war ebenfalls sehr stark markiert, was in den schnell wachsenden Zellen (Synchronkultur!) natürlich ist. Der geringe Abfall dürfte darauf beruhen, daß das beim Stoffwechsel der RNS - besonders die m-RNS unterliegt ja einem sehr schnellen turn-over - freiwerdende Phosphat in die Zuckerphosphate eingebaut wird.

3435 Rest-P (Protein-P, DNS):

(Diese Fraktion ist in Abb. 13 nicht dargestellt) Diese Fraktion änderte sich während der Versuche praktisch nicht. Dies entsprach den Erwartungen.

Damit war klargestellt, daß die nach Substratgaben auftretende Steigerung des Po auf dem Anstieg der stabilen Zucker-Phosphate beruht. Die hauptsächlichste Phosphatquelle bilden dabei die Polyphosphate "C" und (oder) "D". Weiterhin kann geschlossen werden, daß diese Polyphosphate neben den Phosphatgruppen auch die Energie für die Phosphorylierung des Substrates liefern dürften (in diesem Fall für die Bildung von Glucose-6-P und 2-Desoxy-glucose-6-P). Denn das Licht hat auf diesen Schritt keinen Einfluß, wie das stabile Po nach 2-Desoxy-glucose-Gaben zeigt. Also kann ATP nicht in diese Reaktion eingreifen, da sonst im Licht durch das höhere ATP-Angebot eine Beschleunigung der Reaktion eintreten dürfte (SANTARIUS und Mitarb. 1964). Eine beteili-

gung des ATP an dieser Phosphorylierung müßte auch zu einer Steigerung des Po führen, wenn man 2-Desoxyglucose und ^{32}P kurzfristig gibt. Die bisher berichteten Ergebnisse lassen sich also am besten so deuten, daß mit dem Phosphatrest auch die Phosphatenergie von den Polyphosphaten direkt auf die Zucker übertragen wird. Ein Enzym, das diese Reaktion katalysiert, wurde bereits von SZYMONA und OSTROWSKY (1964) aus Mycobacterium phlei isoliert und als "anorganische Polyphosphat-Glucokinase" bezeichnet. DIRHEIMER und EBEL isolierten ein solches Enzym aus Corynebacterium xerosis (1962, 1964), sie bezeichneten es als "Polyphosphat-Glucose-Phosphotransferase".

Zur Sicherung dieser Ergebnisse und zur Klärung der Frage, ob diese Reaktion nur in p h o s p h a t - v e r a r m t e n Ankistrodesmus braunii abläuft oder auch in normal gezogenen Algen, wurden noch folgende Versuchsreihen ausgeführt (Abs. 35):

a) Bei vormarkierten Algen wurden mit Maximaldosen von DCMU und Antimycin A die oxydative und die Lichtphosphorylierung gehemmt (URBACH und SIMONIS 1964; SIMONIS 1966). Ein Phosphorylierung von gebotenen Substraten konnte dann nur mit Hilfe der Phosphatenergie der Polyphosphate erfolgen. Ein Anstieg des Po nach Substratgaben in den gehemmten Algen würde dann also einwandfrei die Aktivität einer Polyphosphat-Glucose-Phosphotransferase gezeigt haben.

b) Der Abbau der Polyphosphate ließ sich nach ROTHSTEIN (1954), van STEVENINCK (1963), so wie van STEVENINCK und ROTHSTEIN (1965) durch Uranyl-Ionen hemmen. Danach mußten sie auch die Glucoseaufnahme hemmen, falls diese den genannten Reaktionen entsprechend abläuft. Da die Glucoseaufnahme auch bei nicht P-verarmten Al-

gen untersucht werden konnte, war es gleichzeitig möglich zu prüfen, ob diese Reaktion nur in P-verarmten oder auch in normal gezogenen Ankistrodesmus braunii abläuft.
Bei diesen Versuchen wurde gleichzeitig die Lichtabhängigkeit der Glucoseaufnahme gemessen.

35 Wirkung von Hemmstoffen auf die Aufnahme und die Phosphorylierung exogener Substrate.

351 Untersuchung der Glucoseaufnahme.

Mit der Prüfung der Hemmung der Glucoseaufnahme durch Uranyl-Ionen sollte auch die Glucoseaufnahme bei Ankistrodesmus braunii im Licht und im Dunkeln untersucht werden.

3511 Glucoseaufnahme im Licht und im Dunkeln.

Nach KANDLER (1954 a), TAYLOR (1959) sowie BUTT und PEEL (1963) wird Glucose von Grünalgen im Licht schneller als im Dunkeln aufgenommen. Zunächst sollte deshalb geprüft werden, ob sich dieser Effekt an P-verarmten Zellen von Ankistrodesmus braunii ebenfalls finden läßt. Wie in Abs. 2263 beschrieben, sollten diese Versuche den ^{32}P-Einlagerungsversuchen möglichst ähnlich sein. Einen solchen Versuch zeigt Versuch Nr. GA 13, das Ergebnis ist in Abb. 14, S. 64, dargestellt.

Versuch GA 13:

Ansatz:

44,4 ml	Algensuspension,
5,0 ml	Phthalatpuffer pH 5,6,
6,6 ml	Wasser,
56,0 ml	
- 5,0 ml	Kontrollprobe
51,0 ml	
+ 9,0 ml	Glucoselösung (150 µg / ml Endkonz.)
60,0 ml	

Temperatur: 30° C,
Beleuchtung: 2 x 10^4 Lux,
Belüftung: Luft ohne CO_2,

Versuchsablauf:

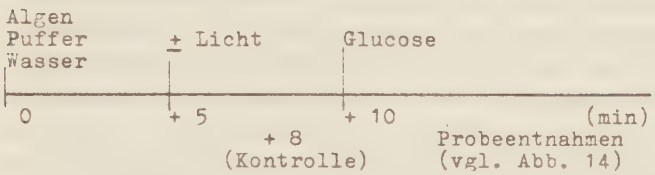


Abb. 14 bringt klar zum Ausdruck, daß im Licht viel mehr Glucose als im Dunkeln aufgenommen wird. Im Licht werden ca 25 % des Trockengewichtes der Algen in 60 min aufgenommen, im Dunkeln sind es ca 16 %. Die Aufnahme erwies sich über einen langen Zeitraum hinweg konstant (im dargestellten Versuch über 120 min), was ebenfalls mit den Ergebnissen von KANDLER (1954) übereinstimmt.

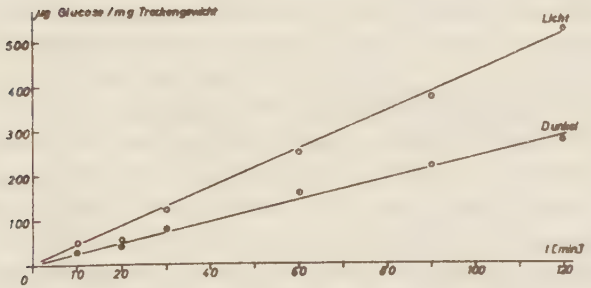


Abb. 14: Glucoseaufnahme (in µg / mg Trockengewicht) durch Ankistrodesmus braunii im Dunkeln und im Licht.

Dieses Ergebnis stellt keinen Gegensatz zu der oben entwickelten These dar, daß die Bildung von G-6-P aus aufgenommener Glucose mit Hilfe der Polyphosphate geschieht und nicht lichtabhängig ist. Die Glucose muß ja, um weiter umgesetzt zu werden, nochmals phosphoryliert werden (Bildung von UDPG bzw. ADPG beim Aufbau von Stärke, Bildung von F-1,6-dP bei der Glykolyse). Dieser zweite Phosphorylierungsschritt ist wohl lichtabhängig. Er verbraucht ATP und muß somit durch eine gesteigerte Phosphorylierung im Licht beschleunigt werden. Dies bedeutet gleichzeitig, daß dieser Schritt, bzw. die dafür nötige Energie den begrenzenden Faktor der Glucoseaufnahme darstellen kann. Allerdings muß bei diesen Überlegungen in Betracht gezogen werden, daß Licht evtl. über eine Erhöhung der Polyphosphat-synthese die Glucoseaufnahme beeinflussen kann.

3512 Uranylhemmung der Glucoseaufnahme.

Diese Versuche wurden, wie erwähnt, mit nicht P-verarmten Algen ausgeführt, um zu prüfen, ob die Polyphosphate nur bei P-verarmten Zellen aktiviert werden oder auch bei normal gezogenen Algen als P- und Energiedonatoren dienen (MIYACHI 1963; vgl. auch BAKER und SCHMIDT 1964). Die Algen wurden jedoch vor dem Versuch in P-freie Nährlösung übergeführt, da das in der Lösung enthaltene Phosphat das zugegebene Uranyl ausfällt. Anschließend wurden die Algen verdunkelt. Um selbst eine geringfügige P-Verarmung zu vermeiden, wurden auch die Versuche im Dunkeln ausgeführt. Als Küvetten dienten in diesem Versuch Warburg-Gefäße (vgl. Abs. 2232). Die Anlage dieser Versuche zeigt Versuch GA 21. Das Ergebnis aus vier gleichartigen Versuchen ist in Abb. 15 dargestellt.

Versuch GA 21:

Ansatz: 3,0 ml Algensuspension,
0,2 ml K-Phthalatpuffer pH 5,6,
0,4 ml Glucoselösung (150 µg / ml Endkonz.)
0,4 ml Uranylnitratlösung,
4,0 ml

Versuchsdauer: 60 min
Beleuchtung: keine
Belüftung: Luft ohne CO_2,
Temperatur: 30° C,

Die Kurve in Abb. 15 zeigt, daß die Uranylionen die Glucoseaufnahme deutlich hemmen, wenn auch die Algen gegenüber diesem Hemmstoff offensichtlich resistenter reagieren als Hefezellen (vgl. ROTHSTEIN und Mitarb. 1947; van STEVENINCK 1963), so daß höhere Konzentrationen nötig sind. Allerdings muß auch ein geringer efflux von Phosphat aus den Zellen angenommen werden, nachdem die Algen in das P-freie Medium überführt wurden. Dieses Phosphat kann aber nach ROTHSTEIN

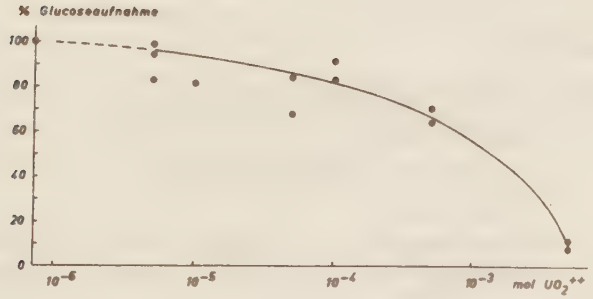


Abb. 15: Wirkung der Uranyl-Ionen auf die Glucoseaufnahme nicht P-verarmter Algen im Dunkeln.

(1954) die Hemmung durch Uranyl-Ionen wieder aufheben. Der Einfluß reicht jedoch aus um zu zeigen, daß die Polyphosphate bei der Glucoseaufnahme wohl eine Rolle spielen.

352 Aufnahme der 2-Desoxy-glucose durch vormarkierte Algen nach Hemmung mit DCMU und Antimycin A.

Antimycin A und DCMU hemmen, wenn sie zusammen gegeben werden, die oxydative und die Lichtphosphorylierung (URBACH und SIMONIS 1964; SIMONIS 1965). Damit wird auch die Einlagerung von ^{32}P in das Po vermindert (URBACH und SIMONIS 1964). An vormarkierten Algen sollte nun geprüft werden, ob nach der Blockierung der Phosphorylierungsvorgänge (=Blokkierung der ATP-Bildung) Substratgaben noch eine Wirkung auf das Po haben. Als Substrat für diese Versuche wurde 2-Desoxy-glucose benutzt, um einen Abbau des gebildeten Hexose-6-Phosphates während des Versuches zu verhindern. Zunächst sei die Versuchsanordnung und -durchführung beschrieben.

Versuch H 47:

Ansatz:	60,0	ml	Algen
	- 8,0	ml	für 2 Kontrollproben
	52,0	ml	
	+ 0,525	ml	Hemmstofflösung s. u.,
	52,525	ml	
	- 8,000	ml	für 2 Proben
	44,525	ml	
	+ 0,450	ml	2-Desoxyglucose-lösung (0,912 mg/ml)
	44,975	ml	
	(45,0	ml)	

Hemmstoffe: DCMU 2 x 10^{-5} mol
Antimycin A 45 /ug / ml } Endkonzentration,
Belüftung: Luft ohne CO_2,
Belichtung: 2 x 10^4 Lux,
Temperatur: 30° C,

Der Versuchsablauf und die Ergebnisse sind in Abb. 16 dargestellt.

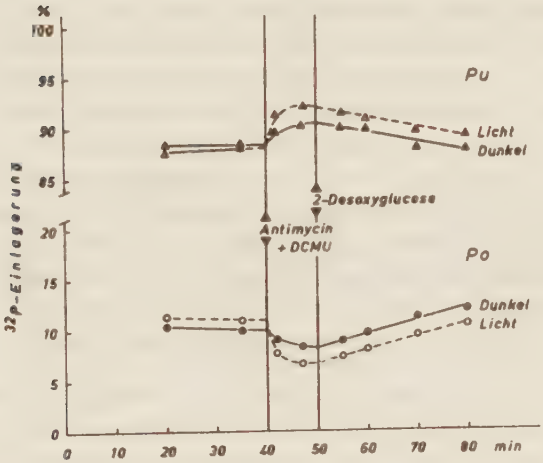


Abb. 16: Einfluß von 2-Desoxy-glucose auf das Po und Pu vormarkierter Algen, die zuvor mit DCMU und Antimycin A gehemmt worden waren, im Dunkeln und im Licht.

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigen, daß im Po (stabil) sofort nach Zugabe der Hemmstoffe ein Abfall des Po eintritt, wie er aufgrund der Literatur zu erwarten ist. Er beruht offensichtlich darauf, daß die Desphosphorylierungsreaktionen weiterlaufen, während die Phosphorylierung gestoppt ist.

Das Po strebt deshalb sofort nach der Hemmung einem tieferen Niveau zu. Aus der Geschwindigkeit des Abfalls zum Zeitpunkt der Hemmstoffzugabe, die sich durch eine Tangente an die Kurve durch diesen Punkt ermitteln läßt, kann die Dephosphorylierungs- und damit auch die Phosphorylierungsgeschwindigkeit berechnet werden (vgl. KANDLER 1955 b; 1958). In dem dargestellten Versuch ergibt sich so, daß im Licht in ca 2 - 2,5 min, im Dunkeln in ca 9 - 10 min die Hälfte des Po umgesetzt wird.
Nach Zugabe der 2-Desoxyglucose tritt aber wieder ein Anstieg ein, wie er bei den bisherigen Versuchen mit vormarkierten Algen gefunden wurde (vgl. Abs. 342). Dies bedeutet, daß das Substrat aufgenommen und phosphoryliert wird, obwohl kein ATP mehr zur Verfügung steht. Die Phosphatenergie muß also aus einer anderen Quelle stammen. Diese Quelle ist nach den oben dargelegten Ergebnissen die Polyphosphatfraktion der Zellen, vor allem Polyphosphat "C" und "D". Die fragliche Reaktion wird damit durch diese Versuche nochmals gesichert.

36 Stöchiometrie

Aufgrund der auffällig hohen Glucoseaufnahme soll noch die Stöchiometrie einer solchen Aufnahme im Vergleich zum Verbrauch an Polyphosphaten untersucht werden.

Der Phosphatgehalt der benutzten Algen betrug zwischen

1,0 und 1,8 /uMol / mg Trockengewicht.

Der Gehalt an Polyphosphaten betrug davon ca 30 bis 35 % (40 bis 60 % bei KADEN-DOMANSKI 1965) [1]). Nimmt man einen mittleren Gesamt-P-Gehalt von 1,4 /uMol/mg Trockengewicht, so entspricht dies ca

0,465 /uMol als Polyphosphat gebundenes Phosphat / mg Trockengewicht.

Nach dem dargestellten Versuch Nr. GA 13, Abb. 14, S. 64 betrug die Glucoseaufnahme 140 /ug/h im Dunkeln und 260 /ug/h im Licht (jeweils pro mg Trokkengewicht). Dies entspricht einer Aufnahme von

0,78 bzw. 1,44 /umol/h . mg Trockengewicht.

Die in der Stunde aufgenommene Glucosemenge ist also wesentlich größer, als die der vorhandenen Polyphosphate. Es muß somit ein sehr schneller Stoffwechsel der Polyphosphate stattfinden, wenn das Schema der vermuteten Reaktion richtig sein soll. Die Kurve des Pu in Abb. 16, S. 68, zeigt allerdings, daß dies durchaus möglich sein dürfte. Ein schneller Umsatz der Polyphosphate "A" und "C" wurde auch von MIYACHI und Mitarb. (1964) an Chlorella ellipsoidea

[1]) Die in dieser Arbeit gefundenen, niedrigeren Werte können durch die Hydrolyse bei der Extraktion, durch die Verarmung vor dem Versuch und evtl. durch eine noch nicht völlig erreichte Gleichmarkierung erklärt werden. Für die Berechnung wurden aber bewußt die niedrigeren, d. h. ungünstigeren, Werte angesetzt.

festgestellt. Sie bezeichnen - allerdings unter Photosynthesebedingungen - diese beiden Polyphosphatfraktionen direkt aus Zwischenprodukte zwischen anorganischem Phosphat und phosphorylierten Produkten, besonders bei der Nucleinsäuresynthese. Ob dies zur Erklärung der sehr hohen Glucoseaufnahme bei Ankistrodesmus braunii wirklich ausreicht, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Bei der Aufnahme der 2-Desoxy-glucose bleibt das gebildete -6-Phosphat liegen (vgl. Fußnote S. 58). Hier läßt sich demnach die Aufnahme anhand der Zunahme im stabilen Po direkt ablesen. Sie beträgt in 60 min ca 10 bis 13 % des ^{32}P der vormarkierten Zellen. Dies entspricht bei angenommener Gleichverteilung

0,14 bis 0,18 /uMol / h.mg Trockengewicht.

Wird kein Polyphosphat nachgebildet, so muß die Aufnahme nach ca 3 h zum Stillstand kommen. Die im Verhältnis zur 2-Desoxy-glucose-Aufnahme geringere Erniedrigung der Markierung in den Polyphosphaten spricht auch hier für eine gleichzeitige Neubildung. Bei der Glucoseaufnahme kann diese Polyphosphat-Synthese jedoch wesentlich schneller ablaufen, da ein Teil der Glucose zur Energiegewinnung veratmet werden kann.
Daraus ist zu fordern, daß bei Glucoseverarbeitung auch eine stärkere Markierung des Pu auftreten muß. Dies ist tatsächlich bei Glucosevorgaben gefunden worden (vgl. Abb. 9,S. 46). Ob dabei allerdings die Polyphosphate "C" und (oder) "D" stärker als die anderen Verbindungen dieser Fraktion markiert werden, wie es zu fordern wäre, ist noch nicht untersucht worden.

4 Diskussion

Die Versuche im ersten Teil der Arbeit hatten ergeben, daß Glykolsäure den Phosphatstoffwechsel bei Ankistrodesmus braunii, insbesondere die erhöhte ^{32}P-Markierung im Licht, nicht beeinflußt. Dies ließ sich im wesentlichen darauf zurückführen, daß die Glykolsäure unter den Versuchsbedingungen nicht aufgenommen wurde. Zunächst soll deshalb versucht werden, dafür Erklärungsmöglichkeiten zu finden (Abs. 41). Anschließend werden dann die Ergebnisse der Versuche mit Glucose und 2-Desoxy-glucose und die daraus gezogenen Folgerungen besprochen (Abs. 42).

41 Deutung der mit Glykolsäure erzielten Ergebnisse

Gegenüber den Vorstellungen eines Zusammenhanges zwischen Phosphatstoffwechsel und Glykolsäure (TOLBERT und ZILL 1956) zeigten die Ergebnisse, daß nicht die Glykolsäure, wie JACOBI (1959) berichtete, sondern das gleichzeitig zugesetzte Natrium die Wirkung auf den Einbau des radioaktiven Phosphats hervorrief. Die Glykolsäure selbst wurde von den Algen gar nicht aufgenommen. Im folgenden soll eine Deutung für diese Ergebnisse gesucht werden.

4111 Einfluß des pH-Wertes auf die Glykolsäureaufnahme.

In der Literatur wird berichtet, daß Glykolsäure nur als freie Säure, nicht als Glykolat-Ion aufgenommen wird, wie dies für viele schwache Säuren gilt (SYRETT 1962). MILLER und Mitarb. (1963) stellten fest, daß Chlorella pyrenoidosa Glykolsäure bei pH 4,5 wesentlich schneller aufnimmt als bei pH 8,5; TOLBERT (1956) fand an Gerstenkeimlingen, daß nur Glykolsäure, nicht aber Na-Glykolat aufgenommen wird. Ebenso fanden

KEARNEY und TOLBERT (1962) keine Aufnahme von Na-Glykolat in isolierte Chloroplasten. MYERS (1947) zeigte, daß Chlorella pyrenoidosa Glykolsäure erst unterhalb von pH 3,8 verarbeitet, was er auf die Permeabilität zurückführte. SCHOU und Mitarb. (1950) führten ihre Versuche sogar bei pH 2,8 durch, um eine möglichst hohe Glykolsäureaufnahme zu erreichen. Daß allgemein undissoziierte Moleküle schwacher Säuren schneller aufgenommen werden als die entsprechenden Anionen wird häufig berichtet, so u. a. von BALL und Mitarb. (1947). URBACH (1961; vgl. auch WINTERMANS 1955) fand eine pH-Abhängigkeit der DNP-Wirkung bei Ankistrodesmus braunii, was er auf die unterschiedliche Aufnahme undissoziierter und dissoziierter Moleküle zurückführte.
Da bei den oben beschriebenen Versuchen mit Ankistrodesmus braunii Glykolsäure bei pH 4,5 nicht aufgenommen wurde, kommt eine Aufnahme bei pH 8,0 sicher nicht in Frage (ORTH und Mitarb. 1966). Damit ist aber bei Versuchen in diesem pH-Bereich auch eine Wirkung auf den ^{32}P-Einbau nicht möglich.

4112 Einfluß des Phosphatmangels auf die Glykolsäureaufnahme.

Man könnte daran denken, daß auch durch den Phosphatmangel der Algen erklärt wird, warum sie die Glykolsäure nicht aufnehmen. Für die Untersuchung der Glykolsäureaufnahme wurden nur selten einzellige Grünalgen benutzt, etwa bei MILLER und Mitarb. (1963). Bei diesen Versuchen waren die Algen jedoch in Phosphatpuffer suspendiert, während bei den hier berichteten Versuchen mit phosphatverarmten Algen in phosphatfreier Nährlösung gearbeitet wurde. Wie wichtig Phosphat für die Aufnahme der Glykolsäure ist, stellten TOLBERT und ZILL (1956) fest. Sie konnten die Glykolsäureausscheidung von Chlorella durch Phosphatgaben verhin-

dern, bzw. die Rückresorption der ausgeschiedenen Glykolsäure beschleunigen. Allerdings haben ORTH und Mitarb. (1966) auch bei Chlorella und Chlamydomonas, die in Phosphatpuffer (pH 8 - 9) aufgeschwemmt waren, Glykolsäureausscheidung gemessen. SCHOU und Mitarb. (1950), KORNBERG (1960) und WANG (1962) haben phosphorylierte Verbindungen (vor allem Zucker) als Folgeprodukte der Glykolsäure gefunden. Daraus kann man auf eine Konkurrenz zwischen Glykolsäure, bzw. einem ihrer Folgeprodukte, und anderen Akzeptoren um die Phosphatbindungsenergie schließen. Bei P-Mangel kann dies dazu führen, daß die Glykolsäure nur sehr langsam bzw. gar nicht verarbeitet wird und deshalb auch nicht aufgenommen werden kann. Diese Erklärung ist aber nicht sehr wahrscheinlich, da z. B. phosphatverarmte Zellen Glucose sehr schnell einbauen. Außerdem hat die Auftrennung des Pu gezeigt, daß auch nach kurzer P-Verarmung noch sehr viel Polyphosphat in den Zellen vorhanden ist, das als P-Reserve dienen kann.

4113 Biochemische Unterschiede zwischen einzelnen Algenstämmen.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit bieten die bekannten biochemischen Unterschiede zwischen verschiedenen Stämmen bestimmter Organismen, wie sie für die Gattung Chlorella von KESSLER und Mitarb. (1963) zusammengestellt worden sind. Es wäre denkbar, daß der von uns verwendete Stamm von Ankistrodesmus braunii (Nr. 202-70 der Algensammlung Pringsheim) Glykolsäure nicht aufnehmen oder nicht umsetzen kann. Ob dies jedoch zutrifft, oder ob die Versuchsbedingungen für den negativen Ausfall der Versuche verantwortlich sind, müßte durch weitere Versuche geprüft werden.

42 Deutung der Versuche mit Glucose und 2-Desoxy-glucose.

421 These

Die Algen, sowohl Ankistrodesmus braunii (vgl. Abs. 351), wie auch Chlorella pyrenoidosa (KANDLER 1954, vgl. auch TANNER und Mitarb. 1965; BUTT and PEEL 1963), nehmen Glucose im schwach sauren Milieu (pH 5,6 bzw. 5,0 bis 7,5 bei KANDLER) im Licht schneller auf als im Dunkeln [1]). Dennoch soll aufgrund der oben vorgetragenen Ergebnisse die Behauptung aufgestellt werden, daß weder die Glucoseaufnahme als solche, noch die Phosphorylierung zum Glucose-6-Phosphat (G-6-P) lichtabhängig sind. Dies soll im folgenden genauer erörtert werden.

Zuvor sollen jedoch einige wichtige Termini so definiert werden, wie sie im folgenden gebraucht werden.

422 Definitionen

4221 Aufnahme:

Als Aufnahme soll lediglich der Eintritt eines Moleküls, bzw. Ions aus dem Medium durch die Zellgrenzflächen bezeichnet werden. Die Adsorption (Eintritt der Moleküle in den Freilösenden Raum) ist noch keine Aufnahme (LUNDEGÅRDH 1958 a, b, c; MACDONALD und LATIES 1963). Der Begriff "Aufnahme" soll unabhängig vom jeweiligen, oft sehr spezifischen Aufnahmemechanismus benutzt werden (LOUGHMAN 1960; LATIES 1959; BROUWER 1965) [2]).

---

[1]) von EBERIUS (pers. Mitteilg.) wurde auch bei pH 8,0 bei Ankistrodesmus braunii eine sehr hohe Lichtförderung der Glucoseaufnahme gefunden.

[2])WILBRANDT (1963) bezeichnet die Aufnahme durch die Zellmembran mit Hilfe eines Trägers bereits als Transport, obwohl hierbei u. U. nur eine erleichterte Diffusion auftritt.

4222 Transport (= aktive Aufnahme):

Damit sollen alle Aufnahmevorgänge bezeichnet werden, bei denen zur Aufnahme von Stoffen in die Zelle Energie notwendig ist (LUNDEGÅRDH 1958 a, b, c; LATIES 1959; LATIES und MACDONALD 1963; HONG 1965). Dabei ist es unerheblich, wie im Einzelfall die Energie aufgebracht wird (Salzatmung, Substratphosphorylierung o. ä.). Diese Energie kann im einfachsten Fall dadurch aufgebracht werden, daß der aufgenommene Stoff laufend durch Stoffwechselvorgänge umgebaut wird, so daß das Konzentrationsgefälle vom Medium in die Zelle erhalten bleibt. Ein Beispiel dafür ist die Phosphorylierung aufgenommener Glucose zum G-6-P (LEGGETT 1961; NEWSHOLME und Mitarb. 1964; WALSH und HARLEY 1962; TANNER und Mitarb. 1965; EGAN und MORSE 1966).

4223 Weiterverarbeitung:

Für eine langanhaltende Aufnahme nach dem oben angeführten Beispiel muß der nach der Aufnahme veränderte Stoff meistens weiterverarbeitet werden, damit nicht nach einer Sättigung der Gleichgewichte durch einen Rückstau die Aufnahme gestoppt wird (NEWSHOLME und Mitarb. 1964). (Eine andere Form der Entfernung aufgenommener Stoffe aus dem Gleichgewicht ist eine Ablagerung in der Vakuole, wie sie besonders bei der Akkumulation anorganischer Ionen häufig auftritt). Eine einmalige Umwandlung genügt also meist nicht. Im vorliegenden Fall muß die Glucose zu G-6-P und dann weiter zu Stärke oder über die Glykolyse umgebaut werden, wobei nochmals Energie aufgebracht werden muß (Bildung von F-1,6-dP oder von ADPG bzw. UDPG). Indirekt wird hierbei der Umsatz eines aufgenommenen Substrates zum Antrieb für die weitere Aufnahme.

4224 Photoassimilation:

Mit diesem Begriff wird im allgemeinen die im Licht

gegenüber Dunkel erhöhte Substrataufnahme bezeichnet (vgl. u. a. TANNER und Mitarb. 1965). Da mit diesem Begriff eine Anzahl von Teilschritten bezeichnet wird, er aber nichts über die eigentliche Stelle des Lichteingriffes aussagt, soll er hier nicht verwendet werden.

423 Z u s a t z a n n a h m e n

Für den Beweis der obigen These müssen noch zwei Annahmen gemacht werden, die aber durch die Literatur gut gesichert sind:

a) Das in den Chloroplasten bei Belichtung oder in den Mitochondrien gebildete ATP ist in der ganzen Zelle verfügbar(SANTARIUS und Mitarb. 1964; BRIERLEY und Mitarb. 1962).
b) Das in die Zelle aufgenommene ^{32}P wird vornehmlich über ATP in die anderen Verbindungen eingebaut (MIETTINNEN; BORST-POWELS 1956; LEGGETT 1961).

424 B e g r ü n d u n g d e r T h e s e .

4241 Erhöhung der ^{32}P-Einlagerung in das Po bei Glucosegaben.

Glucose steigert den Einbau von ^{32}P in das Po im Dunkeln und im Licht beträchtlich. Dieser Anstieg ist im Dunkeln relativ größer als im Licht, obwohl man das Gegenteil erwarten würde, da im Licht mehr Glucose aufgenommen wird (vgl. auch MOSTAFA 1960).
2-Desoxy-glucose zeigt demgegenüber keinerlei derartige Wirkung, wenn sie gleichzeitig mit der Aktivität gegeben wird. Sie beeinflußt also den E i n b a u von markiertem Phosphat n i c h t , obwohl sie nach der Literatur (LETNANSKY 1964; FISCHER und WEIDEMANN 1964; OVERGAARD-HANSEN 1965), wie auch nach den Ergebnissen mit vormarkierten Algen zu 2-Desoxy-glucose-6-Phosphat phosphoryliert werden dürfte. Dieser

Widerspruch läßt hier bereits die Vermutung zu, daß die Unterschiede nach Gaben von Glucose bzw. 2-Desoxy-glucose durch die weitere Verarbeitung des G-6-P zustande kommen, während die 2-Desoxy-6-Phosphoglucose unverändert liegen bleibt, bzw. nur so verändert wird, daß sie den Glucosestoffwechsel nicht mehr beeinflußt.

4242 Versuche mit vormarkierten Algen.

Die Versuche, in denen ^{32}P-vormarkierte Algen 2-Desoxy-glucose geboten wurde, zeigen, daß sie den Phosphatstoffwechsel stark beeinflußt. Nach der Zugabe der 2-Desoxy-glucose tritt im Po im Licht und im Dunkeln ein deutlicher Anstieg ein, sie wird also aufgenommen und phosphoryliert. Allerdings kann sie nur aus einer P-Quelle phosphoryliert werden, die bei gleichzeitiger ^{32}P-Aufnahme n i c h t markiert wird und die vor allem nach wenigen min Versuchsdauer noch kein markiertes Phosphat abgibt. Es muß also eine Verbindung(-sgruppe) sein, die nur einen relativ langsamen Stoffwechsel besitzt. Dies heißt weiter, daß ATP als solches für die Phosphorylierung der 2-Desoxy-glucose zum 2-Desoxy-glucose-6-Phosphat, wenn überhaupt, nur eine sehr untergeordnete Rolle spielt. Das gleiche trifft dann höchstwahrscheinlich für die Phosphorylierung der Glucose zum G-6-P zu.

4243 Die Ergebnisse der genaueren Auftrennung der Fraktionen.

Eine weitere Stütze für die These liefern die Versuche, in denen die einzelnen Fraktionen, besonders das Pu, noch weiter aufgetrennt wurden.
Diese Experimente zeigen, daß Glucose - im Licht stärker als im Dunkeln - die Markierung des stabilen (= Zucker-) Po in Form einer Sättigungskurve erhöht, wie es aufgrund des Stoffwechsels der Glucose zu er-

warten ist. Nach Zugabe von 2-Desoxy-glucose steigt dagegen das stabile , markierte, Po im Dunkeln und im Licht geradlinig an [1]). Das gebildete 2-Desoxy-glucose-6-Phosphat bleibt also in den Zellen unverändert liegen. Bei diesem Anstieg ist auch - sieht man vom unterschiedlichen Ausgangsniveau der Kurven ab - keine Lichtförderung mehr zu erkennen. Daraus ist bereits der Schluß möglich, daß das Licht diesen Schritt n i c h t beeinflußt.

Gleichzeitig mit dem Anstieg des stabilen Phosphats nach Hexose-Gaben zeigen die Versuche, daß die Abnahme des Pu hauptsächlich durch die Abnahme der Fraktion des Polyphosphates "C" und "D" zustande kommt. Daß allerdings die Kurven nicht genau entsprechend verlaufen, kann folgendermaßen erklärt werden:

a) Die Bildung der Polyphosphate läuft auch während der Substrataufnahme weiter, die Abnahme tritt dadurch nicht so deutlich in Erscheinung.
b) Die Extraktion dieser Verbindungen ist zum Teil mit einer Hydrolyse verbunden (vgl. Abs. 22543), was zu einer größeren Streuung der erhaltenen Werte führt.

Dennoch ist die Abnahme dieser Fraktion in den entsprechenden Versuchen so gesichert, daß ein Irrtum ausgeschlossen ist, zumal keine andere Fraktion ein derartiges Verhalten zeigt.

In Zusammenhang mit dem unter 4241 und 4242 gesagten dürfte damit gesichert sein, daß die Polyphosphate - zumindest in P-verarmten Zellen - das für die Phosphorylierung aufgenommener Zucker nötige Phosphat liefern.

---

[1]) Daß das angestaute 2-Desoxy-glucose-6-Phosphat nicht rückwärts zu einer Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit und damit der Aufnahme führt, wie es LETNANSKY (1964) an Ehrlich-Aszites-Tumorzellen gefunden hat, könnte vielleicht am ehesten damit erklärt werden, daß die Phosphorylierung der Zellmembran ablauft, während das Produkt im Cytoplasma angereichert wird.

4244 Uranylhemmung der Glucoseaufnahme.

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurde dann untersucht, wie Uranyl-Ionen, die den Abbau der Polyphosphate hemmen (vanSTEVENINCK 1963; van STEVENINCK und ROTHSTEIN 1965), auf die Glucoseaufnahme wirken. Für die Versuche wurden, wie oben (vgl. Abs. 33) beschrieben, nicht P-verarmte Algen benutzt. Da im P-freien Medium gearbeitet werden mußte, um eine Wechselwirkung zwischen Uranyl- und gelösten Orthophosphat-Ionen zu vermeiden, wurden diese Versuche nur im Dunkeln ausgeführt, um eine Verarmung während der Belichtung zu vermeiden. Wie die Versuche zeigen, wird die Glucoseaufnahme der nicht P-verarmten Algen durch Uranyl-Ionen gehemmt. Unter der Voraussetzung, daß die Uranyl-Ionen eine spezifische Hemmung des Polyphosphatabbaues hervorrufen, sind diese Versuche in Übereinstimmung mit der These, daß die Polyphosphate eine Rolle bei der Aufnahme und der Verarbeitung der Glucose spielen. Sie wird mit Hilfe der Polyphosphate phosphoryliert, auch ohne daß eine "stress"-Situation (BAKER und SCHMIDT 1964) vorliegen muß.

4245 Die Energiequelle

Nachdem durch diese Versuche ermittelt worden war, woher das Phosphat für die Phosphorylierung exogener Zucker kommt, erhebt sich die Frage, woher die Energie für diese Phosphorylierung stammt. Um diese Frage zu klären, wird folgende Betrachtung angestellt:

a) Oben (Abs. 421) war behauptet worden, daß das Licht auf die Phosphorylierung der Glucose zum G-6-P keinen Einfluß hat, was durch den Verlauf der Kurven des stabilen Po nach Zugabe von 2-Desoxy-glucose, die keinen Licht-Dunkel-Unterschied erkennen lassen, bewiesen ist (2-Desoxy-glucose wird nur in 2-Desoxy-6-Phospho-glucose umgewandelt und nicht weiter verarbeitet (vgl. Abs. 4254)).

Die für diese Reaktion notwendige Phosphatenergie muß also aus einer Quelle stammen, auf die das Licht - wenigstens während der Versuchsdauer - keinen Einfluß hat.

b) Gleichzeitig war vorausgeschickt worden (Abs. 423 a)), daß die verschiedenen ATP-Pools der Zelle miteinander im Gleichgewicht stehen, daß also auch photosynthetisch gebildetes ATP im Cytoplasma verfügbar ist.

c) Das ATP der Zellen wird durch ^{32}P sehr schnell markiert (BORST-POWELS 1956; LEGGETT 1961).

d) Gibt man gleichzeitig 2-Desoxy-glucose und ^{32}P, so müßte eine Steigerung der Markierung des Po durch markiertes 2-Desoxy-glucose-6-Phosphat eintreten, wenn die 2-Desoxy-glucose mit Hilfe von ATP - das dann ja markiert ist - phosphoryliert würde. Freies ATP spielt also bei der Phosphorylierung aufgenommener Zucker zum -6-Phosphat keine Rolle. Damit kommen auch andere Nucleotide, die mit ATP im Gleichgewicht stehen, nicht in Frage.

e) In Zellen, die k e i n e Polyphosphate enthalten, nimmt nach Zugabe von 2-Desoxy-glucose der Nucleotidgehalt stark ab (LETNANSKY 1964; a, b; OVERGAARD-HANSEN 1965). Dies wird von den Autoren darauf zurückgeführt, daß nach Verbrauch der veratembaren Substrate für die Phosphorylierung der aufgenommenen 2-Desoxy-glucose (die die Atmung nicht unterhält) keine Phosphorylierung mehr stattfindet. Die erhöhte Konzentration der Nucleosid-Mono-Phosphate führt dann zu deren Abbau. Ein derartiger Abfall des labilen bzw. aktivkohle-adsorbierten Po (vgl. die Kurven S. 57, Abb. 13) wird aber in den beschriebenen Versuchen nicht beobachtet. Auch das spricht gegen eine Beteiligung von ATP oder anderen Nucleotiden bei der Phosphorylierung der aufgenommenen 2-Desoxy-glucose. Dies gilt speziell für die Versuche im Dunkeln. Im Licht ist die Regenera-

tion des verbrauchten ATP durch die Lichtphosphorylierung möglich.

f) Somit bleiben für die Lieferung der nötigen Energie nur die Polyphosphate übrig. Die Pyrophosphatbindungen sind energiereich, sie können also mit dem Phosphatrest auch die Energie für die Phosphorylierung exogener Zucker liefern. Diese Reaktion kann nicht über den Umweg einer Phosphorylierung von ADP durch die Polyphosphate laufen, da sonst eine Wechselwirkung mit dem restlichen ATP der Zelle und auch mit den Phosphorylierungsvorgängen eintreten müßte (COLE und HUGHES 1965; HOFFMANN-OSTENHOFF und Mitarb. 1957; KORNBERG 1957).

g) Die Algen, Ankistrodesmus braunii, müssen also ein Ferment enthalten, daß diese Reaktion katalysiert, eine "Polyphosphat-Glucose-Phosphotransferase" (DIRHEIMER und EBEL 1962).

Ein solches Enzym ist zwar bisher in Grünalgen noch nicht gefunden worden, wohl aber in Bakterien, nämlich von SZYMONA (1963), SZYMONA und OSTROWSKY (1964) in Mycobacterium phlei und von DIRHEIMER und EBEL (1962, 1964) in Corynebacterium xerosis. Nach den dargelegten Tatsachen dürfte auch Ankistrodesmus braunii ein solches Enzymsystem besitzen. Hierzu sind weitere Versuche jedoch erforderlich.

4246 Versuche mit Antimycin A und DCMU:

Dieses Ergebnis wird noch durch die Versuche mit den Phosphorylierungs-Hemmstoffen bestätigt. Nach URBACH und SIMONIS (1964), sowie SIMONIS (1966) führen Gaben von Antimycin A + DCMU zu einer starken Hemmung der Photophosphorylierung wie auch der oxydativen Phosphorylierung. In den berichteten Versuchen zeigte sich dementsprechend bei vormarkierten Algen nach der Hemmstoffapplikation ein unmittelbarer Abfall im Po. Nach der Zugabe von 2-Desoxy-glucose stieg das Po wieder

so an, wie es auch bei nicht gehemmten Algen der Fall ist. Dies besagt, daß in beiden Fällen das gleiche System bei der Phosphorylierung der exogenen Zucker aktiv ist und daß dieses System u n e m p f i n d l i c h gegen die nahezu vollständige Hemmung der ATP-Bildung ist. Ein ähnliches Experiment hat van STEVENINCK (1963) an Hefen durchgeführt. Sie nahmen bei blockiertem Stoffwechsel Glucose weiter auf, wobei die Polyphosphate abnahmen.
Gleichzeitig zeigt der Abfall des Po nach der Hemmstoffzugabe, daß das nach dem Ausfall der Phosphorylierungsreaktionen fehlende ATP nicht durch Übertragung von energiereichem Phosphat von den Polyphosphaten auf ADP ergänzt wird. Es ist also bereits aus diesem Grunde unwahrscheinlich, daß eine solche Reaktion bei der Zuckeraufnahme eine Rolle spielt.

4247 Einwirkung des Lichtes.

Nun ist noch zu klären, worin die einwandfrei vorhandene Lichtwirkung bei der Glucoseaufnahme oder -verarbeitung besteht. Da auf die Phosphorylierung der Glucose zum G-6-P das Licht keinen Einfluß haben soll, kann nur ein zweiter Phosphorylierungsschritt lichtabhängig sein. Bei diesem Schritt spielt ATP sicher eine Rolle, ob es sich um den glykolytischen Abbau des G-6-P handelt oder um den Aufbau von Stärke über ADPG oder UDPG (KAUSS und KANDLER 1962; ASHWELL 1964; GREENBERG und PREISS 1964; MURATA und AKAZAWA 1966). An dieser Stelle kann das durch die Lichtphosphorylierung gebildete ATP eingreifen und durch die zusätzliche Energie auch die Reaktion beschleunigen, so daß sie im Licht schneller als im Dunkeln abläuft. Dies besagt weiter, daß im Dunkeln das verfügbare ATP, bzw. die oxydative Phosphorylierung der "Minimumfaktor" für diesen zweiten Phosphoylierungsschritt und damit für die ganze Reaktionskette sein

müßte. Durch das im Licht zusätzlich verfügbare ATP werden Umsatz und damit auch Aufnahme der Glucose beschleunigt, bis ein anderer Faktor ins Minimum tritt. Daraus ergibt sich, daß unter anderen Bedingungen auch eine andere Reaktion den begrenzenden Schritt bilden dann und daß dann das Licht die Glucoseaufnahme nicht steigert. Dies ist schon von MYERS (1947) an Chlorella pyrenoidosa gefunden worden: er fand weder mit Glucose noch mit Azetat (vgl. SYRETT 1962) eine Steigerung der Aufnahme im Licht. Welcher Faktor bei diesen Versuchen den begrenzenden Schritt darstellte, ist natürlich nicht zu sagen.
Im Hinblick auf die quantitativen Unterschiede der Glucose- und der 2-Desoxy-glucose-aufnahme muß auch eine indirekte Lichtwirkung über eine Neusynthese von Polyphosphaten in Betracht gezogen werden. Es ist wohl anzunehmen, daß einer lichtabhängigen Polyphosphatbildung bei der länger dauernden Glucoseaufnahme eine Bedeutung zukommt, sie wirkt jedoch kaum von Anfang an auf die Glucose- bzw. 2-Desoxy-glucoseaufnahme ein.

425 Kritik an der Beweisführung.

Nach der Darlegung dieser Beweiskette muß sie noch kritisiert werden, denn es handelt sich nur um einen indirekten Schluß auf eine Reaktion, der noch fehlerhaft sein kann.

4251 Isolierung des Fermentes.

Die aufgestellte und so weit wie möglich bewiesene These stellt nur ein Reaktionsschema dar, mit dem die erzielten Ergebnisse widerspruchslos erklärt und in einen Zusammenhang gebracht werden. Wenn auch für diese Reaktion beweise aus der Literatur vorliegen (DIRHEIMER und EBEL 1962, 1964; SZYMONA 1962), so

scheint sie doch nicht allgemein verbreitet zu sein. SZYMONA und OSTROWSKY (1964) haben sie z. B. an Brauhefe nicht nachweisen können, obwohl KUHL (1960) bereits auf die Möglichkeit hinweist, daß die Polyphosphate und die entsprechenden Polyphosphatasen die Anreicherung freier Glucose in gärenden Hefezellen verhindern. Dies bedeutet, daß auch erst in Ankistrodesmus braunii die postulierte Polyphosphat-Glucose-Phosphotransferase gefunden und isoliert werden muß, bevor die Reaktion gesichert ist. Bis dahin ist noch der Fall denkbar, daß ein (unbekanntes) Nucleotid, das mit dem ATP-Umsatz keinen Zusammenhang hat, als P-Überträger fungiert. Dies ist zwar unwahrscheinlich, da für eine solche Reaktion keine Beweise in der Literatur gefunden werden und sie viel komplizierter als die angenommene ist. Dennoch ist dieser Fall nicht völlig auszuschließen.

4252 Welche Reaktion katalysiert das Ferment?

Die Algen nehmen die Glucose vom Augenblick der Zugabe an mit konstanter Geschwindigkeit auf, sie müssen sie also auch von Anfang an mit konstanter Geschwindigkeit phosphorylieren. Daß dies der Fall ist, zeigen die Kurven des stabilen Po nach 2-Desoxy-glucose-Zugabe zu vormarkierten Algen (vgl. Abb. 13, S. 57). Die "Polyphosphat-Glucose-Phosphotransferase" ist also voll aktiv, obwohl die Algen nicht an Glucose adaptiert waren (sie wuchsen in einem rein anorganischen Medium, das nur EDTA als Fe-Komplex enthielt, vgl. Abs. 21). Damit stellt sich sofort die Frage "Was macht das Ferment im normalen Stoffwechsel der Algen, wenn kein Substrat von außen aufgenommen wird?" Welche Reaktionen hier ablaufen, ist vor Isolierung und genauer Untersuchung des Ferments nicht zu sagen.

Es ist allerdings denkbar, daß die Wildform von Ankistrodesmus braunii auch organische C-Quellen benutzt,

die nach der Aufnahme mit Hilfe der Polyphosphate phosphoryliert werden. Dann muß es sich hierbei um eine unspezifische "Polyphosphat-Substrat-Phospho-Transferase" handeln. Dieses Enzym müßte konstitutiv sein, da es nach so langer Kultur des benutzten Stammes noch voll aktiv ist (vgl. BRESCH 1965).

4253 Warum der Umweg über die Polyphosphate?

Die Aufnahme organischer Substrate über eine Phosphorylierung mit Hilfe der Polyphosphate ist ein Umweg und deshalb zunächst unwahrscheinlich. Eine direkte Phosphorylierung mit ATP ist demgegenüber einfacher, weil sie über weniger Zwischenstufen verläuft; sie wäre deshalb auch naheliegender.
Dagegen ist jedoch zu sagen, daß die verwendeten Glucosekonzentrationen (0,056 Mol / l) eigentlich "unphysiologisch" sind und unter natürlichen Bedingungen nicht auftreten. Es kann aber für den Organismus ein Vorteil sein, wenn er mit Hilfe der Polyphosphate schnell größere Mengen nicht sofort veratembarer Substrate aufnehmen und phosphorylieren kann. Nach FOTT (1959) sind die Arten der Gattung Ankistrodesmus vor allem in mesosaproben Gewässern verbreitet, die eng verwandte Gattung Hyaloraphidium umfaßt sogar nur farblose Saprophyten. In diesem Formenkreis besteht also eine Tendenz zur saprophytischen Lebensweise. Dies macht verständlich, warum ein besonderer Mechanismus zur Aufnahme organischer Substrate vorhanden sein könnte. Zum Vergleich wären Untersuchungen über einen entsprechenden Aufnahme- bzw. Phosphorylierungsmechanismus bei völlig autotrophen Algen, etwa aus der Gattung Chlorella, notwendig. Sie liegen aber bisher noch nicht vor.

4254 Die stöchiometrischen Verhältnisse.

Ein weiterer, noch nicht restlos geklärter Punkt sind

die stöchiometrischen Verhältnisse. Die von den Algen aufgenommenen Mengen der beiden Hexosen sind so unterschiedlich (vgl. Abs. 36, S. 70), daß es fraglich ist, ob die Aufnahme in beiden Fällen über die gleichen Schritte verläuft. Es ist zwar anzunehmen, daß das gebildete 2-Desoxy-glucose-6-Phosphat durch einen "Rückstau" zur Verminderung der Aufnahme führt, während die Glucoseaufnahme durch den ständigen Umsatz der Folgeprodukte ungehindert ablaufen kann. Ob dies jedoch allein zur Erklärung der Unterschiede ausreicht, kann erst nach weiteren Versuchen entschieden werden.
Ebenso ist noch nicht sicher, ob der für die Glucosephosphorylierung nach dem vorgeschlagenen Mechanismus erforderliche Polyphosphatumsatz tatsächlich mit der nötigen Geschwindigkeit abläuft. Auch Hierzu sind noch weitere Versuche erforderlich.

4255 Übertragbarkeit der Ergebnisse.

Obwohl der Polyphosphatstoffwechsel bisher nur an wenigen Organismen untersucht worden ist (vgl. KUHL 1960), so liegen doch bereits einige Arbeiten an Grünalgen vor: von WINTERMANS (1955) sowie von MIYACHI und Mitarb., vgl. KANAI und Mitarb. 1965) an Chlorella, ferner von KADEN-DOMANSKI (1966), sowie KANAI und SIMONIS (im Druck) und ULLRICH (im Druck) an Ankistrodesmus braunii. Außerdem sind kondensierte anorganische Phosphate bereits in zahlreichen Organismen, sogar schon in höheren Pflanzen (Banksia ornata, Proteaceae) von JEFFREY (1964), entdeckt worden. Diese Polyphosphate werden meist als Phosphatreserven gedeutet (MUHAMMED 1961; DREWS 1960; MIYACHI 1963; MIYACHI und Mitarb. 1964). Dies ist sicher ein Teil ihrer Bedeutung, dennoch beginnt sich die Meinung durchzusetzen, daß sie auch eine Form der Energiespeicherung darstellen, nachdem auch entsprechende Enzyme verschiedentlich gefunden wurden (KORNBERG 1957; SZYMONA 1962, 1963; DIRHEIMER und

EBEL 1964; COLE und HUGHES 1965; KANAI, pers. Mitteilg. [1])).
Damit dürften sie auch in einzelligen Grünalgen als Energiespeicher dienen. Die direkte Übertragung der Phosphatenergie von den Polyphosphaten auf ein Substrat sollte dann eigentlich auch in anderen Grünalgen zu finden sein. So lange dafür jedoch Hinweise fehlen, reichen auch die hier angeführten Argumente nicht aus, um eine solche Reaktion bei Ankistrodesmus braunii restlos zu sichern.

4256 Sind die Ergebnisse der Versuche mit Glucose und mit 2-Desoxy-glucose vergleichbar?

Ein letzter Einwand ist noch zu prüfen. Ist es ohne weiteres möglich, die mit Glucose und mit 2-Desoxy-glucose erzielten Ergebnisse so zu vergleichen, wie es hier geschehen ist?
Obwohl dies bisher stillschweigend vorausgesetzt wurde, sind auch hier gewisse Einwände möglich, denn in der Literatur finden sich auch Angaben über eine Verwertung von 2-Desoxy-glucose. So von EICHHORN und CYNKIN (1965), die einen Pseudomonas-Stamm isolierten, der mit 2-Desoxy-glucose als einziger C-Quelle wuchs. Er hatte eine 2-Desoxy-gluconat-dehydrogenase, mit deren Hilfe er dieses Substrat ohne Phosphorylierung verarbeiten konnte. LAMBERT (1965) berichtet von einem Lactobacillus befidus var. pennsylvanicus-Stamm, der 2-Desoxy-2-amino-glucose in Zellwandmaterial einbauen konnte. KALTEICH und Mitarb. (1964) fanden sogar, daß Ratten 2-Desoxy-glucose in Muskelglykogen - allerdings nicht in Leberglykogen! - einbauten. FISCHER und WEIDEMANN (1964 a, b) erhielten sogar 2-Desoxy-glucose beim Umsatz von 2-Desoxy-galactose in Galactose-induzierter Hefe. Allerdings lief die Reaktion nicht weiter, die 2-Desoxy-glucose blieb liegen.
Diese Ergebnisse können aber nicht verallgemeinert

[1]) Interessant ist in diesem Zusammenhang die von STETTEN (1964, 1965) in Rattenlebermicrosomen gefundene Reaktion:
Pyrophosphat + Glucose ---- Pa + G-6-P

werden, denn es liegen in allen Fällen unterschiedliche Reaktionen, z. T. erst nach Sonderbehandlung wie Adaptation oder Mutantenerzeugung vor.
Demgegenüber gibt es zahlreiche Angaben, daß Glucose und 2-Desoxy-glucose um die Aufnahme konkurrieren, bzw. daß 2-Desoxy-glucose die Glucoseaufnahme kompetitiv hemmt (CRAMER und WOODWARD 1952; SCHARFF 1961; FAIN 1963; SCHARFF und MONTGOMERY 1965), wobei allgemein die Phosphorylierung zum jeweiligen -6-Phosphat als der Angriffspunkt betrachtet wird (KIPNIS und CORI 1959; HELMREICH und EISEN 1959; FAIN 1963; AUGUSTIN und Mitarb. 1964; LETNANSKY 1964 a, b, 1965). NEUFELD und GINSBURG (1965) führen sogar die toxische Wirkung von 2-Desoxy-glucose auf das gebildete 2-Desoxy-glucose-6-Phosphat zurück und BARBAN und SCHULTZE (1962) zeigten in Zellkulturen, daß die Resistenz gegen 2-Desoxy-glucose auf einer Hemmung der Hexokinase in diesem Zellen beruht.
Normalerweise bleibt das gebildete 2-Desoxy-glucose-6-Phosphat also in den Zellen liegen (LETNANSKY 1964 a, b, 1965; OVERGAARD-HANSEN 1965; NEUFELD und GINSburg 1965), wie dies auch bei unseren Versuchen der Fall sein dürfte (vgl. die Kurve des stabilen Po in vormarkierten Algen nach 2-Desoxy-glucose-Fütterung, sowie die Fußnote S. 58). Ein weiterer Schritt, der auf die Bildung des 2-Desoxy-glucose-6-Phosphates folgt, ist wohl nicht anzunehmen. Eine andere Phosphorylierungsreaktion, die durch die 2-Desoxy-glucos. ausgelöst wird und nicht gleichzeitig Glucose phosphoryliert, ist ebenfalls nicht anzunehmen.

Man darf also auch für Ankistrodesmus braunii erwarten, daß die applizierte 2-Desoxy-glucose zum 6-Phosphat phosphoryliert wird und dann liegenbleibt, wie dies auch die Kurven der entsprechenden Versuche zeigen. Damit ist auch zu erwarten, daß beide Substrate, Glucose und 2-Desoxy-glucose, vom gleichen Ferment in der gleichen Reaktion zum jeweiligen 6-Phosphat

umgesetzt werden. Auch die Ergebnisse der Versuche lassen keine andere Deutung zu.
Damit ist zwar die Frage, ob die Ergebnisse, die mit den beiden Substraten erzielt worden sind, verglichen werden können, positiv zu beantworten. Dennoch kann natürlich auch hier die letzte Sicherheit nur erreicht werden, wenn die Reaktion in vitro ausgeführt wird.

5 Anhang

51 Zusammenfassung

511 Glykolsäure

1. Glykolsäure steigert in verschiedenen Konzentrationen die Aufnahme und den Einbau von ^{32}P in Ankistrodesmus braunii nicht.

2. Die von JACOBI (1959) beschriebene Wirkung der Glykolsäure wird auf die gleichzeitige Anwesenheit von Na-Ionen zurückgeführt.

3. Die Glykolsäure wird unter den Versuchsbedingungen nicht aufgenommen.

512 Glucose und 2-Desoxy-glucose

4. Glucosegaben zeigen eine deutliche, konzentrationsabhängige Wirkung auf die Phosphateinlagerung im Dunkeln und im Licht.

5. Die Markierung des Po wird dabei - im Dunkeln relativ stärker als im Licht - gesteigert. Die Gesamteinlagerung wird demgegenüber nur wenig verändert.

6. Beim Vergleich mehrerer pH-Bereiche, die in der Literatur angegeben sind, erwies sich pH 5,6 für den Glucoseeinfluß am günstigsten.

7. Vorgaben von Glucose fördern die Einlagerung von ^{32}P in alle drei Fraktionen in Abhängigkeit von der Vorgabedauer.

8. Aus den Versuchen an vormarkierten ($\pm$ gleichmarkierten)Algen ergibt sich, daß nach Glucosegaben der Po-Pool im Dunkeln und im Licht ansteigt und

der Pu-Pool erniedrigt wird.

9. Bei Anwesenheit von CO_2 tritt dieser Effekt der Glucose nur sehr undeutlich auf (Konkurrenz von CO_2 und Glucose). Es wurde deshalb immer unter Ausschluß von Kohlendioxyd gearbeitet.

10. Die glucose-analoge Verbindung 2-Desoxy-glucose zeigt im Gegensatz zu Glucose keine Wirkung auf die Aufnahme und den Einbau von ^{32}P.

11. In Versuchen mit vormarkierten Algen ruft 2-Desoxy-glucose dagegen eine Steigerung des Po-Pools und einen entsprechenden Abfall im Pu-Pool hervor.

12. Mit Hilfe ^{32}P-vormarkierter Algen wurden die Veränderungen der Poolgrößen noch genauer untersucht. Dabei zeigte sich folgendes:
    a) Im stabilen Po-Pool (Zucker-Phosphat) ruft Glucose eine Steigerung in Form einer Sättigungskurve hervor, die eine Förderung im Licht erkennen läßt.
    b) Nach 2-Desoxy-glucose-zugabe steigt das stabile Po jedoch lichtunabhängig linear an.
    c) Dieser Anstieg der stabilen Zucker-Phosphate ist mit einer entsprechenden Abnahme der Polyphosphate "C" und (oder) "D" verbunden.

13. Die Glucoseaufnahme durch die Algen erfolgt lichtabhängig.

14. Uranyl-Ionen hemmen die Glucoseaufnahme, auch bei nicht P-verarmten Algen.

15. DCMU und Antimycin A, in maximalen Dosen geboten, verursachen eine Abnahme des Po-Pools im Dunkeln und im Licht.

16. Derart gehemmte Algen zeigen aber nach 2-Desoxy-glucose-zugabe den gleichen Anstieg des Po-Pools wie nicht gehemmte Algen.

17. Aus den Punkten 4., (5.), 8., 10., 11., 12., 14., 15., und 16. wird geschlossen:
   a) Der erste Schritt der Glucoseaufnahme ist nicht lichtabhängig.
   b) Die untersuchten Hexosen werden nach der Aufnahme mit Hilfe der in den Polyphosphaten gespeicherten Energie phosphoryliert.
   c) Es wird die Annahme gemacht, daß diese Reaktion durch eine "Polyphosphat-Glucose-Transphosphorylase" katalysiert wird.
   d) Die Reaktion verläuft ohne Beteiligung von ATP.
   e) Der bei der Weiterverarbeitung der Glucose notwendige zweite Phosphorylierungsschritt benötigt ATP und ist lichtabhängig.
   f) Die für diesen Schritt nötige Energiezufuhr oder u. U. die Neusynthese der Polyphosphate stellen die begrenzenden Faktoren für die Glucoseaufnahme dar.

18. Die stöchiometrische Prüfung zeigt, daß - zumindest während der Glucoseaufnahme - auch eine schnelle Neusynthese von Polyphosphaten stattfinden muß.

19. Die Ergebnisse, besonders die Folgerungen in Punkt 17., werden mit der Literatur verglichen und ausführlich erörtert.

52 Verzeichnis der Abkürzungen.

ADP	Adenosindiphosphat
ADPG	Adenosindiphospho-glucose
AFS	Apparent free space (=freilösender Raum)
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat.
BTS	Brenztraubensäure
DCMU	Diuron = 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-Dimethyl-Harnstoff.
DETPP	Di-Äthanol-Thiaminpyrophosphat
DNP	2,4-Dinitrophenol
DNS	Desoxyribosenucleinsäure
EDTA	Äthanoldiamintetraessigsäure
F-1,6-P	Fructose-1,6-di-Phosphat
G-6-P	Glucose-6-Phosphat
Ges.-P	Gesamt-Phosphat (in Tabellen)
GlP	Gesamt-lösliches-Phosphat
IpM	Impulse pro Minute
K	Kontrolle (in Tabellen)
Li (Du)	Licht (Dunkel)(in Tabellen)
Pa	anorganisches Orthophosphat
Po	organisch-TCE-lösliches Phosphat
Po labil	säurelabiles organisch-TCE-lösliches P
Po stabil	säurestabiles organisch-TCE-lösliches P
PGS	Phosphorglycerinsäure
Poly-P	Polyphosphat
Pu	organisches TCE-unlösliches Phosphat
RNS (m-RNS)	(messenger-)Ribose-Nukleinsäure
Stefi	Steh-Filtergerät
TCE	Trichlor-Essigsäure
TPP	Thiaminpyrophosphat
Tris	Tris-hydroxy-methyl-amino-Methan
UDPG	Uridindiphospho-glucose

53 Literaturverzeichnis

ARNON, D. I. — Plant. Phys. 24, 10 - 15 (1949)

ARNON, D. I. — "Mechanisms of Photosynthesis" 5th. int. Congr. Biochemistry Moskau 1963. H. Tamiya edit. p. 201 - 231

ASHWELL, G. — Ann. Rev. Biochemistry 33, 101 - 138 (1964)

AUGUSTIN, H. W.
HÄCKER, M. R.
HOFMANN, E. — Ztschr. f. Physiol. Chem. 339 42 ff. (1964)

AVRON, M. — Biochem. Biophys. Acta 40 257 - 272 (1960)

BAKER, A. L.
SCHMIDT, R. R. — Biochem. Biophys. Acta 82, 624 - 626 (1964)

BALL, E. G.
AUFINSEN, C. B.
COOPER, O. — J. Biol. Chem. 168, 257 - 270 (1947)

BARBAN, S.
SCHULTZE, H. O. — J. Biol. Chem. 237, 291 - 293 (1962)

BORST-POUWELS, G. W. F. H. — Dissertation (Thesis) Leiden (1956)

BRESCH, C. — Klassische und molekulare Genetik Berlin - Heidelberg - New York 1965 p. 244

BRIERLEY, G. P.
BACHMANN, E.
GREEN, D. E. — Proc. Natl. Acad. Sci. 48, 1928 - 1935 (1962)

BROUWER, R. — Ann. Rev. Plant Phys. 16, 241 - 266 (1965)

BURGER, M.
HEJINOVA, L.
KLEINZELLER, A.
Biochem. J. 71, 233 - 242 (1959)

BUTT, V. S.
PELL, M.
Biochem. J. 88, 31 - 35 (1963)

CALKINS, V. P.
Industr. Engin. Chemistry, Analyt. Ed. 15, 763 (1943)

CALVIN, M.
Rapp. 3me intern. Congr. Biochem. Bruxelles 1955
P. 111 - 125

COHEN, G. N.
MONOD, J.
Bacteriol. Rev. 21, 169 - 194 (1957)

COLE, J. A.
HUGHES, D. E.
J. gen. Microbiol. 38, 65 - 72 (1965)

CRAMER, F. B.
WOODWARD, G. E.
J. Franklin Inst. 253, 354 (1952)

DIRHEIMER, G.
EBEL, J.-P.
Compt. rend. des séances de l'Acad. des Sci. 254, 2850 - 2852 (1962)

DIRHEIMER, G.
EBEL, J.-P.
Soc. de Biologie de Strasbourg 158, 1948 - 1950 (1964)

DREWS, G.
Arch. Microbiol. 36, 387 - 430 (1960)

EEGRIWE, E.
Z. analyt. Chem. 89, 121 - 125 (1932)

EICHHORN, M. M.
CYNKIN, M. A.
Biochemistry 4, 159 - 165 (1965)

EGAN, J. B.
MORSE, M. L.
Biochim. Biophys. Acta 112, 63 - 67 (1966)

EMERSON, R.
STAUFFER, J. F.
UMBREIT, W. W.
Amer. J. Bot. 31, 107 (1944)

FAIN, J. N.	Fed. Proc. 22, 166, (1963)
FISCHER, W. WEIDEMANN, G.	Ztschr. f. Physiol. Chem. 336 195 - 218 (1964 a)
FISCHER, W. WEIDEMANN, G.	Biochim. Biophys. Acta 93, 677 - 680 (1964 b)
FOLIN, O. WU, H.	J. Biol. Chem. 43, 149 (1922)
FOTT, B.	Algenkunde Dt. Übersetzung Jena 1959 p. 253 - 258
GREENSBERG, E. PREISS, J.	J. Biol. Chem. 240, 2341 - 2345 (1965)
HELMREICH, E. EISEN, H. N.	J. Biol. Chem. 234, 1958 (1959)
HOFFMANN-OSTENHOFF, O. SLECHTA, L.	Proc. Intern. Symp. Enzyme Chem., Tokyo, Kyoto 1957 p.180 - 189
HONG, S. MIN	J. Cell. Comp. Physiol. 65, 243 - 249 (1965)
JACOBI, G.	Planta 53, 402 - 411 (1959)
JÄRNEFELT, J.	Biochim. Biophys. Acta 48 104 - 110 (1964)
JEFFREY, D. W.	Austr. J. Biol. Sci. 17, 845 - 854 (1964)
KADEN-DOMANSKI, J.	Dissertation Würzburg 1966
KALTEICH, W. E. KUNZENDORF, H. J. LUTZE, G. PRECHT, H. SEIRING, R. LIESE, W. AUGUSTIN, H. W. HOFMANN, E.	Ztschr. f. Physiol. Chem. 338, 118 ff. (1964)

KANAI, R.
AOKI, S.
MIYACHI, S.
Plant and Cell Physiol. 6, 467 - 473 (1965)

KANDLER, O.
Ztschr. f. Naturf. 5b, 423 - 437 (1950)

KANDLER, O.
Ztschr. f. Naturf. 10b, 38 - 46 (1955 a)

KANDLER, O.
Ztschr. f. Naturf. 9b, 625 - 644 (1954)

KANDLER, O.
Naturwissensch. 42, 390 (1955 b)

KANDLER, O.
Physiol. Plant. 11, 675 - 684 (1958

KAUSS, H.
KANDLER, O.
Ztschr. f. Naturf. 17 b, 858 - 860 (1962)

KEARNEY, P. C.
TOLBERT, N. E.
Arch. Biochem. Biophys. 98, 164 - 171 (1962)

KESSLER, E.
LANGNER, W.
LUDEWIG, J.
WIECHMANN, H.
Microalgae and Photosynthetic Bacteria, Festschr. f. H. Tamiya. Tokyo, 1963 p. 7 - 20

KIPNIS, D. M.
CORIS, C. F.
J. Biol. Chem. 234, 171 (1959)

KORNBERG, S. R.
Biochim. Biophys. Acta 26, 294 - 300 (1957)

KORNBERG, H. L.
SADLER, J. R.
Nature 185, 153 - 155 (1960)

KUCZMAK, M.
TOLBERT, N. E.
Plant Phys. 37, 728 - 734 (1962)

KUHL, A.
Ergeb. Biol. 23, 144 - 185 (1960)

LAMBERT, R.
SAITO, Y.
VEERKAMP, J. H.
Arch. Biochem. Biophys. 110, 341 - 345 (1965)

LATIES, G. G.
Ann. Rev. Plant Physiol. 10, 87 - 112 (1959)

LATZKO, E.
Biochem. Biophys. Acta 47, 350 - 357 (1960)

LATZKO, E.
MECHSNER, K.
Naturwissensch. 45, 247 (1958)

LEGGETT, J. E.
Plant Physiol. 36, 277 - 284 (1961)

LETNANSKY, K.
Biochem. Ztschr. 341, 74 - 84 (1964 a)

LETNANSKY, K.
Biochim. Biophys. Acta 87, 1 - 8 (1964 b)

LOUGHMAN, B. C.
Plant Phys. 35, 418 - 424 (1960)

LUNDEGÅRDH, H.
Physiol. Plant. 11, 332 - 346 (1958 a)

LUNDEGÅRDH, H.
Physiol. Plant. 11, 564 - 571 (1958 b)

LUNDGLÅRDH, H.
Physiol. Plant. 11, 585 - 598 (1958 c)

MACDONALD, I. R.
Plant. Phys. 38, 38 - 44 (1963)

MARTLAND, M.
ROBISON, R.
Biochem. J. 20, 848 - 855 (1926)

MECHSNER, K.
Biochem. Biophys. Acta 33, 150 - 158 (1959)

MIETTINNEN, K. J.
Intern. Conference in Radioisotopes in Scentific research.

MILLER, R. M.
MEYER, C. M.
TANNER, H. A.
Plant. Phys. 38, 184 - 188 (1963)

MIYACHI, S. in "Photosynthetic Mechanisms of Green Plants" B. Kok und A. Jagendorf ed., Washington 1963 p. 688 - 697

MIYACHI, S.
KANAI, R.
MIHARA, S.
MIYACHI, S.
AOKI, S. Biochim. Biophys. Acta 93, 625 - 634 (1964)

MOSTAFA, I. Y. Dissertation Würzburg 1960

MUHAMMED, A. Biochim. Biophys. Acta 54, 121 ff. (1961)

MURATA, R.
AKAZAWA, R. Arch. Biochem. Biophys. 114,

MYERS, J. J. Gen. Phys. 30, 217 - 227 (1947)

NEUFELD, E. F.
GINSBURG, V. Ann. Rev. Biochem. 34, 297 ff. (1965)

NEWSHOLME, E. A.
RANDLE, P. J.
GARLAND, P. B. Biochem. J. 93, 641 - 652 (1964)
652 - 665

ORTH, G. M.
TOLBERT, N. E.
JIMENEZ, E. Plant Phys. 41, 143 - 147 (1966)

OVERGAARD-HANSEN, K. Biochim. Biophys. Acta 104, 330 - 347 (1965)

PRISON, A.
RUPPEL, H. G. Arch. Mikrobiol. 42, 299 - 309 (1962)

ROTHSTEIN, A.
FRENKEL, A.
LARRABEE, C. J. Cell. Compl Physiol. 32, 261 - 274 (1947)

ROTHSTEIN, A. Symp. Soc. Exptl. Biol. 8, 165 ff (1954)

ROTHSTEIN, A. — Faraday Soc. Disc. 21, 229 - 238 (1956)

RUBEN, S. — J. Amer. Chem. Soc. 65, 279 (1943)

SAMEJIMA, H.
MYERS, J. — J. gen. Microbiol. 18, 107 - 117 (1958)

SANTARIUS, K. A.
HEBER, U.
ULLRICH, W.
URBACH, W. — Biochem. Biophys. Res. Comm. 15, 139 - 146 (1964)

SAUERMANN, G. — Naturwissensch. 53, 87 - 88 (1966)

SCHARFF, T. G. — Arch. Biochem. Biophys. 95, 329 - 335 (1961)

SCHARFF, T. G.
MONTGOMERY, O. L. — Life Sciences 4, 1049 - 1053 (1965)

SCHOU, L.
BENSON, A. A.
BASSHAM, J. A.
CALVIN, M. — Physiol. Plant. 3, 487 - 494 (1950)

SIMONIS, W. — Ztschr. f. Naturf. 11b, 354 - 363 (1956)

SIMONIS, W. — Handb. d. Pflanzenphysiol. Bd. V 1
W. Ruhland ed.
p. 966 - 1013 (1960)

SIMONIS, W. — Currents in Photosynthesis
2nd W.-Europ. Conf. on Photosynth.
Rotterdamm 1966
p. 217 - 223

SIMONIS, W.
GRUBE, K. H. — Ztschr. f. Naturf. 8b, 312 - 317 (1953)

SIMONIS, W.
KATING, H. — Ztschr. f. Naturf. 11b, 165 - 172 (1956)

SIMONIS, W. KUNTZ, F. J. URBACH, W.	Vorträge aus d. Gesamtgeb. d. Botanik. Neue Folge 1, 139 - 148 (1962)
SIMONIS, W. MECHLER, E.	Biochem. Biophys. Res. Comm. 13, 241 - 245 (1963)
SIMONIS, W. URBACH, W.	Arch. Microbiol. 46, 265 - 286 1963 a
SIMONIS, W. URBACH, W.	Microalgae and Photosynthetic Bacteria. Festschr. f. H. Tamiya Tokyo 1963 (b) p. 597 - 611
SKOU, J. C.	Biochem. Biophys. Res. Comm. 10, 79 - 84 (1963)
SQUIRES, R. F.	Biochem. Biophys. Res. Comm. 19, 27 - 32 (1965)
STETTEN, M. R.	Fed. Proc. 23, 535 (1964)
STETTEN, M. R.	J. Biol. Chem. 240, 2258 (1965)
van STEVENICK, J.	Biochem. J. 88, 25 ff (1963)
van STEVENINCK, J. ROTHSTEIN, A.	J. Gen. Phys. 49, 235 - 246 (1965)
STREHLER, B. L.	Arch. Biochem. Biophys. 34, 809 (1951)
SYRETT, P. J. BOCKS, S. M. MERRETT, M. J.	J. Exptl. Bot. 15, 35 - 47 (1964)
SZYMONA, M.	Acta biochim. polonica 9 165 - 181 (1962)
SZYMONA, M.	5th Intern. Congr. Biochem. Moskau Abstr. Comm. 5-65, Bd. IX (1963) p 168 ff

SZYMONA, M. OSTROWSKI, W.	Biochim. Biophys. Acta 85, 283 (1964)
TANNER, W. DACHSEL, L. KANDLER, O.	Plant. Phys. 40, 1151 - 1156 1965
TAYLOR, F. J.	Proc. Royal Soc. (London) B 151, 483 - 496 (1959)
TOLBERT, N. E.	(1956) vgl. TOLBERT, N. E. und COHAN, M. S. (1955)
TOLBERT, N. E. COHAN, M. S.	J. Biol. Chem. 214 639 - 649 (1955)
TOLBERT, N. E. ZILL, L. P.	J. Biol. Chem. 222, 895 - 906 (1956)
URBACH, W.	Dissertation Würzburg 1961
URBACH, W. SIMONIS, W.	Biochem. Biophys. Res. Comm. 17, 39 - 46 (1964)
VERNON, L. P. ZAUGG, W. S.	J. Biol. Chem. 235, 2726 (1960)
WALSH, J. H. HARLEY, I. L.	New Phytol. 61, 299 - 323 (1962)
WARBURG, O. KRIPPAHL, G.	Ztschr. f. Naturf. 15b, 197 - 199 (1960)
WEICHART, G.	Dissertation Hannover 1959
WEICHART, G.	Planta 56, 262 - 289 (1961)
WILBRANDT, W.	Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle. P. Karlson ed. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1963 p. 219 - 231

WINTERMANS, J. F. G. M. Meded. Landbouwhogeschool Wageningen 55, 69 ff (1955)

YANAGITA, T. Papers read at Mtg. Japan. Biochem. Soc. Tokyo (1960)

YANAGITA, T. J. Biochem. 55, 260 - 268 (1964)

ZÖLLNER, N. Hoppe-Seyler's Ztschr. Physiol. Chem. 291, 157 - 163 (1952)

54 Lebenslauf

30. 1. 1937	In Coburg als Sohn des Architekten Friedemann Lysek und seiner Frau Elfriede, geb. Gerbracht, geboren.
1. 9. 1943	Eintritt in die Volksschule in Magdeburg.
10. 1946	Flucht aus der SBZ von Magdeburg nach Coburg.
1. 9. 1947	Eintritt in die Oberrealschule, Ernestinum, in Coburg.
18. 7. 1956	Abgang von der Oberrealschule Coburg mit dem Reifezeugnis.
1.11. 1956	Beginn des Architekturstudiums an der TH. München.
2. 5. 1958	Immatrikulation an der Universität Würzburg zum Studium der Biologie.
1. 1962	Beginn der Dissertation mit den Untersuchungen über die Glykolsäure.
1.10. bis 30.11. 1962	Studienaufenthalt am Laboratorium voor Cytochemie der R. K. Universiteit in Nimwegen, Holland.
6. 1963	Beginn der Arbeiten mit Glucose und 2-Desoxyglucose.
10. 1964	Staatsexamen in den Fächern Biologie, Chemie und Geographie.

Meine akademische Ausbildung erhielt ich vor allem
in Botanik bei Dr. Kandeler, Prof. Dr. Overbeck (Kiel), Prof. Dr. Simonis, Prof. Dr. Zeidler;
in Chemie bei Prof. Dr. Fischer, Prof. Dr. Hahn, Prof. Dr. Hünig, Prof. Dr. Rödig;
in Geographie bei Prof. Dr. Büdel, Prof. Dr. Gerling, Prof. Dr. Mensching;
in Meeresbiologie bei Prof. dr. Kornemann (Helgoland), Prof. Dr. Schlieper (Kiel);
in Mikrobiologie bei Frau Dr. Ehrenberg, Prof. Dr. Lemke (Kiel);

in Physiologischer Chemie bei Prof. Dr. Turba;
in Zoologie bei Prof. Dr. Gößwald, Prof. Dr. Krause,
Prof. Dr. Wohlfahrt.

OFFSETDRUCK GUGEL
Würzburg, Burkarderstr. 9